

#2
Rec'd PCT/PTO 08 FEB 2005

PCT/JP03/10163

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

08.08.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 8月 8日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-231999
[ST. 10/C]: [JP2002-231999]

REC'D 26 SEP 2003

WIPO PCT

出 願 人
Applicant(s):

科学技術振興事業団
財団法人大阪バイオサイエンス研究所

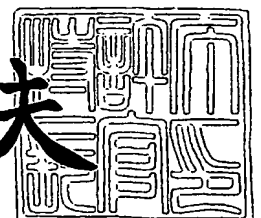
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

2003年 9月11日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02186-YS

【提出日】 平成14年 8月 8日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C07K 14/47
C12N 15/12

【発明の名称】 受容体E R Rのリガンド分子E R R L 1と、
薬剤スクリーニング方法

【請求項の数】 14

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市古江台 6 - 2 - 4
財団法人大阪バイオサイエンス研究所内

【氏名】 垣塚 彰

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市古江台 6 - 2 - 4
財団法人大阪バイオサイエンス研究所内

【氏名】 亀井 康富

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市古江台 6 - 2 - 4
財団法人大阪バイオサイエンス研究所内

【氏名】 大泉 宏

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【特許出願人】

【識別番号】 390000745

【氏名又は名称】 財団法人大阪バイオサイエンス研究所

【代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0013341

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 受容体ERRのリガンド分子ERRL1と、薬剤スクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2のアミノ酸配列を有し、核内受容体ERRのリガンド分子として機能するマウス由来のタンパク質ERRL1をコードするマウス遺伝子。

【請求項2】 請求項1のマウス遺伝子のゲノムDNA、mRNA、cDNAまたはそれらの相補配列から精製されたポリヌクレオチド、またはその一部連続配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項3】 配列番号1またはその一部連続配列からなる請求項2のポリヌクレオチド。

【請求項4】 請求項2または3のポリヌクレオチドを保有する組換えベクター。

【請求項5】 請求項4の組換えベクターによる形質転換体細胞。

【請求項6】 配列番号2のアミノ酸配列からなり、核内受容体ERRのリガンド分子として機能するマウス由来のタンパク質ERRL1。

【請求項7】 請求項2または3のポリヌクレオチドの発現産物である請求項6のタンパク質ERRL1。

【請求項8】 配列番号2のアミノ酸配列における一部連続配列からなるポリペプチドまたはオリゴペプチド。

【請求項9】 請求項6のマウス由来タンパク質ERRL1と同一の機能を有するヒト由来タンパク質。

【請求項10】 請求項9のヒト由来タンパク質をコードするヒト遺伝子。

【請求項11】 請求項10のヒト遺伝子のゲノムDNA、mRNA、cDNAまたはそれらの相補配列から精製されたポリヌクレオチド、またはその一部連続配列からなるポリヌクレオチド。

【請求項12】 請求項6または請求項9のタンパク質に対する抗体。

【請求項13】 請求項3のポリヌクレオチドをゲノムDNAに保有し、請求項6のタンパク質ERRL1を過剰発現するトランスジェニックマウス。

【請求項 14】 肥満および／または糖尿病の治療薬の有効成分物質をスクリーニングする方法であって、細胞または動物個体に候補物質を作用させ、以下の基準：

- (a) リガンド因子ERRL1の発現量を増加させる；
- (b) 核内受容体ERRの発現量を増加させる；
- (c) ERRL1とERRの結合を促進させる；
- (d) MCAD遺伝子産物の発現量を増加させる

のいずれか 1 以上を満たす候補物質を目的物質として特定することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、核内受容体ERR (estrogen receptor-related receptors) の新規リガンド因子ERRL1と、このリガンド分子やその受容体ERRの発現を指標として新規の肥満および／または糖尿病治療薬をスクリーニングする方法に関するものである。

【0002】

【従来技術】

核内受容体によって調整される遺伝子発現の根底にあるもっとも典型的な分子機構は、その受容体のリガンド（例えば、ステロイド、レチノイン酸、甲状腺ホルモンおよびビタミンD₃といった小さな親油性分子）の結合によって開始される (Mangelsdorf, D.J. et al., Cell 83:835-839, 1995)。このようなリガンドの内在レベルは、多段階の酵素工程を経て産生および／または分解へと至るように厳格に調整されている (Honkakoski, P. & Negishi, M. Biochem. J. 347:321-337, 2000)。また、このようなリガンド類はまとめて親油性リガンドまたは内分泌系親油性ホルモンと呼ばれている。リガンドレベルを変えることにより、内分泌系は、体外または体内環境の変化に対して適応、つまりホメオスタシスに貢献している (Mangelsdorf, D.J. et al., Cell 83:835-839, 1995; Giguere, V. Endocr. Rev. 20:689-725, 1999)。このシステムは、リガンドの産生が複雑

に制御されているので、ゆっくりと長期に適応させるには有利に見えるが、迅速に適応させるには不利に思える。一方、ゲノム分析によって、数多くの核内受容体様分子が存在することが予測されているが、それらに固有の親油性リガンドが同定されているものは現在までほとんど知られていない。これらの分子は、まとめてorphan受容体（孤児受容体）と呼ばれている（Giguere, V. *Endocr. Rev.* 20:689-725, 1999）。孤児受容体の活性化メカニズムはまったく分かっていない。エストロゲン受容体関連タンパク質1および2（ERR1および2）がまず初めに孤児受容体と確認され（Giguere, V. et al., *Nature* 331:91-94, 1988; Shigeta, H. et al., *J. Mol. Endocrinol.* 19:299-309, 1997）、またその第三メンバー（ERR3）が近年単離されている（Eudy, J.D. et al., *Genomics* 50:382-384, 1998; Hong, H. et al., *J. Biol. Chem.* 274:22618-22626, 1999）。ERRおよびエストロゲン受容体は構造的に互いに類似性があるが、ERRはエストロゲンに反応しない（Giguere, V. *Endocr. Rev.* 20:689-725, 1999）。一方、ERR1は中鎖アシル補酵素Aデヒドロゲナーゼ（MCAD）、すなわちミトコンドリア脂肪酸 β 酸化の律速酵素をコードする遺伝子に対する重要な転写レギュレーターとして作用すると提唱されている（Sladek, R. et al., *Mol. Cell. Biol.* 17:5400-5409, 1997; Vega, R.B. & Kelly, D.P., *J. Biol. Chem.* 272:31693-31699, 1997）。これらの知見によって、ERRに媒介される遺伝子調節が、一般的には身体的運動によって誘導される脂肪酸 β 酸化を調節することによって、体内におけるエネルギーバランスを制御するに重要な役割を果たしているという概念が導き出されている（Horowitz, J.F. & Klein, S., *Am. J. Clin. Nutri.* 72:558S-563S, 2000）。従って、適切な身体的運動を毎日行うことが、肥満および糖尿病に対抗するもっとも簡単でもっとも有効な方法であるとされている（Baldwin, K.M., *J. Appl. Physiol.* 88:332-336, 2000）。しかしながら、ERRに媒介される遺伝子発現の調節に関する明確な方法や知見の欠如から、この概念は未だに検証できていない。

【0003】

近年、核内受容体分野における研究者達によって、SRC1/p160族（Onate, S.A. et al., *Science* 270:1354-1357, 1995）、P/CAF（Blanco, J.C.G. et al., *Gen*

es Dev. 12:1638-1651, 1998) および CBP/p300 (Chakravarti, D. et al., Nature 383:99-103, 1996; Kamei, Y. et al., Cell 85:403-414, 1996) といった数種類の転写補助因子タンパク質が核内受容体のリガンドに依存する転写を活性化させるに重要な役割を果たすということが明らかにされた。これらはいわゆる共活性因子 (コアクチベーター) と呼ばれ、あまねく広く発現して、またその発現レベルは、細胞が分化している間変化することはない、また外的および内的環境の変化に対応して変化することもないようである。さらに最近になって、PPAR γ 共活性因子-1 (PGC-1) と称されるユニークな共活性因子が同定されている (Puigserver, P. et al., Cell 92:829-839, 1998)。この共活性因子は、組織特異的かつ調整された発現をする点で他の共活性因子から区別される。すなわち、PGC-1は褐色脂肪組織 (BAT)、骨格筋、心臓、腎臓、脳において様々なレベルで発現され、BATにおいては、寒冷ストレスに急に曝された後、あきらかに発現誘導される (Puigserver, P. et al., Cell 92:829-839, 1998)。PGC-1はまた絶食状態下においては、肝臓 (Yoon, J.C. et al., Nature 413:131-138, 2001) および心臓 (Lehman, J.J. et al., J. Clin. Invest. 106:847-856, 2000) 中で発現誘導される。

【0004】

PPAR γ は、脂質生成の重要レギュレーターであることが知られており (Tontonoz, P. et al., Cell 79:1147-1156, 1994)、その発現は脂肪細胞分化中に増大する。しかしながら PGC-1 mRNA 量は、3T3-L1細胞の脂肪細胞分化中には非常に低レベルである。従って、脂肪細胞分化中に機能する PGC-1 とよく似た分子の存在が推定された。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

前記のとおり、核内の孤児受容体 ERR が MCAD 遺伝子発現の調節因子として作用し、この MCAD 遺伝子発現が脂肪酸 β 酸化を調節することによって体内におけるエネルギーバランスを制御し、これによって肥満や糖尿病に対する抵抗性を維持できると考えられる。しかしながら、このような一連のメカニズムの起点となる受容体 ERR へのリガンド分子は未だ特定されていない。

【0006】

肥満や糖尿病に対する抵抗性メカニズムの全容を解明することは、それらの疾患病態を理解し、それらの治療法を開発するうえで極めて重要である。また、そのようなメカニズムの解明は、肥満や糖尿病の新規治療薬の開発にも大きく貢献する。

【0007】

この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、核内の孤児受容体ERRに対する新しいリガンド分子と、その遺伝子操作材料を提供することを課題としている。

【0008】

またこの出願の発明は、前記のリガンド分子や、リガンド分子と受容体ERRとの相互作用を指標として肥満や糖尿病の治療薬成分をスクリーニングする方法を提供することを課題としている。

【0009】

【課題を解決するための手段】

この出願は、前記の課題を解決するものとして、以下の(1)～(14)の発明を提供する。

- (1) 配列番号2のアミノ酸配列を有し、核内受容体ERRのリガンド分子として機能するマウス由来のタンパク質ERRL1をコードするマウス遺伝子。
- (2) 前記発明(1)のマウス遺伝子のゲノムDNA、mRNA、cDNAまたはそれらの相補配列から精製されたポリヌクレオチド、またはその一部連続配列からなるポリヌクレオチド。
- (3) 配列番号1またはその一部連続配列からなる前記発明(2)のポリヌクレオチド。
- (4) 前記発明(2)または(3)のポリヌクレオチドを保有する組換えベクター。
- (5) 前記発明(4)の組換えベクターによる形質転換体細胞。
- (6) 配列番号2のアミノ酸配列からなり、核内受容体ERRのリガンド分子として機能するマウス由来のタンパク質ERRL1。
- (7) 前記発明(2)または(3)のポリヌクレオチドの発現産物である前記発明(6)の

タンパク質ERRL1。

- (8) 配列番号2のアミノ酸配列における一部連続配列からなるポリペプチドまたはオリゴペプチド。
- (9) 前記発明(6)のマウス由来タンパク質ERRL1と同一の機能を有するヒト由来タンパク質。
- (10) 前記発明(9)のヒト由来タンパク質をコードするヒト遺伝子。
- (11) 前記発明(10)のヒト遺伝子のゲノムDNA、mRNA、cDNAまたはそれらの相補配列から精製されたポリヌクレオチド、またはその一部連続配列からなるポリヌクレオチド。
- (12) 前記発明(6)または(9)のタンパク質に対する抗体。
- (13) 前記発明(3)のポリヌクレオチドをゲノムDNAに保有し、前記発明(6)のタンパク質ERRL1を過剰発現するトランスジェニックマウス。
- (14) 肥満および／または糖尿病の治療薬の有効成分物質をスクリーニングする方法であって、細胞または動物個体に候補物質を作用させ、以下の基準：
 - (a) リガンド因子ERRL1の発現量を増加させる；
 - (b) 核内受容体ERRの発現量を増加させる；
 - (c) ERRL1とERRの結合を促進させる；
 - (d) MCAD遺伝子産物の発現量を増加させるのいずれか1以上を満たす候補物質を目的物質として特定することを特徴とする方法。

【0010】

以下、この出願の発明について、実施形態を詳しく説明する。なお、この出願において「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」は特定塩基数の断片を意味するものでなく、一応の目安として100bp以上の断片をポリヌクレオチド、100bp未満の断片をオリゴヌクレオチドとする。同様に、ポリペプチドは30アミノ酸残基以上、オリゴペプチドは30アミノ酸残基未満のペプチドを意味する。また、この発明において使用する様々な遺伝子操作技術等は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献（例えば、Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press

, New York, 1989) 等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能なものである。

【0011】

【発明の実施の形態】

発明(1)は、この発明のリガンド分子ERRL1をコードするマウス遺伝子であり、この遺伝子は、例えば、配列番号1の塩基配列またはその一部配列からなる精製ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドをプローブとしてマウスのゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることによって単離することができる。得られたゲノム遺伝子は、例えば、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法、NASBN (Nucleic acid sequence based amplification) 法、TMA (Transcription-mediated amplification) 法およびSDA (Strand Displacement Amplification) 法などの通常行われる遺伝子増幅法により増幅することができる。

【0012】

このようにして増幅され、単離されたゲノムDNAは、例えばERRL1タンパク質を機能欠損したマウス個体（ノックアウトマウス）の作成に使用することができる。また、その転写産物や発現産物の測定は、後記する肥満治療薬や糖尿病治療薬の成分物質を特定するための指標となる。さらに、この発明(1)のマウス遺伝子（ゲノムDNA）にはタンパク質ERRL1のコード領域に対する発現制御領域（プロモーター／エンハンサー、サプレッサー配列等）が含まれる。これらの発現制御配列は、例えば、ERRL1タンパク質の発現を制御する物質（転写因子等）を探索するための材料として有用である。

【0013】

発明(2)は、発明(1)のゲノム遺伝子やこの遺伝子から転写されるmRNA、mRNAから合成したcDNA等から精製されたポリヌクレオチド（DNA断片やRNA断片）である。例えば、cDNAはマウス細胞から抽出したポリ(A)+RNAを鋳型として、公知の方法 (Mol. Cell Biol. 2, 161-170, 1982; Gene, 150, 243-250, 1994) でcDNAライブラリーを調製し、配列番号1に基づいて合成したプローブを用いてこのcDNAライブラリーをスクリーニングすることによって取得することができる。あるいは、配列番号1に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプライマーとして、

マウス細胞から単離したmRNAを鋳型とするRT-PCR法によっても目的cDNAを合成することもできる。このようにして調製したcDNAは、具体的には配列番号1の塩基配列を有している（発明(3)）。

【0014】

またERRL1 mRNAまたはcDNAには、ERRL1のスプライシングバリエーションをコードするものも含まれる。すなわち、ERRL1のスプライシングバリエーションは配列番号2における156番目Leuから194番目Lysまでが欠失しているため、この欠失領域に対応する配列番号1の497-613が欠失した塩基配列からなるポリヌクレオチドもこの発明(2)の範囲に含まれる。

【0015】

発明(2)のポリヌクレオチドはまた、発明(1)のゲノム遺伝子やこの遺伝子が転写するmRNA、mRNAから合成したcDNAから精製されたポリヌクレオチドの一部連続配列からなるポリヌクレオチドである。すなわち、この部分ポリヌクレオチドの形態は、配列番号1におけるコード領域（ORF）の塩基配列からなるポリヌクレオチドである。

【0016】

これらのポリヌクレオチドは、発明(4)の組換えベクターの形態で、例えばERRL1タンパク質の遺伝子工学的な製造に使用することができる。

【0017】

発明(4)の組換えベクターは、クローニングベクターまたは発現ベクターであり、インサートしてのポリヌクレオチドの種類や、その使用目的等に応じて適宜なものを使用する。例えば、cDNAまたはそのORF領域をインサートとしてこの発明のERRL1タンパク質を生産する場合には、インビトロ転写用の発現ベクターや、大腸菌、枯草菌等の原核細胞や、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞等の真核細胞のそれぞれに適した発現ベクターを使用することができる。また、発明(1)のゲノム遺伝子DNAをインサートとする場合には、BAC (Bacterial Artificial Chromosome) ベクターやコスミドベクター等を使用することもできる。

【0018】

発明(5)の形質転換体細胞は、例えば、前記発明(4)の組換えベクターを用いて

ERRL1タンパク質を製造する場合には、大腸菌、枯草菌等の原核細胞や、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞等の真核細胞等を使用することができる。これらの形質転換体細胞は、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DEAEデキストラン法など公知の方法によって組換えベクターを細胞に導入することによって調製することができる。

【0019】

発明(6)のERRL1タンパク質は、配列番号2のアミノ酸配列からなり、核内受容体ERRのリガンド分子として機能するマウス由来の精製タンパク質である。ここで、「リガンド分子として機能する」とは、ERRL1タンパク質が受容体ERRに特異的に結合し、受容体ERRの機能（例えば、MCAD遺伝子発現に対する転写調節）を促進させることを意味する。また、このERRL1タンパク質には、そのスプライシングバリエーションも含まれる。すなわち、配列番号2における156番目Leuから194番目Lysまでが欠失したタンパク質である。

【0020】

このERRL1タンパク質は、マウス細胞から単離する方法、配列番号2のアミノ酸配列に基づき化学合成によってペプチドを調製する方法等によって得ることができるが、好ましくは、前記発明(2)または(3)のポリヌクレオチドを用いて遺伝子工学的に製造することができる。すなわち、インビトロ転写翻訳系や、発明(5)の形質転換細胞の培養物から単離精製されるERRL1タンパク質（発明(7)）である。

【0021】

例えば、ERRL1タンパク質をインビトロ転写翻訳系で発現させる場合には、前記のポリヌクレオチドを、RNAポリメラーゼプロモーターを有するベクターに挿入して組換えベクターを作製する。このベクターを、プロモーターに対応するRNAポリメラーゼを含むウサギ網状赤血球溶解物や小麦胚芽抽出物などのインビトロ転写翻訳系に添加すれば、目的とするERRL1タンパク質をインビトロで生産することができる。RNAポリメラーゼプロモーターとしては、T7、T3、SP6などが例示できる。これらのRNAポリメラーゼプロモーターを含むベクターとしては、pKA1、pCDM8、pT3/T7 18、pT7/3 19、pBluescript IIなどが例示できる。

【0022】

ERRL1タンパク質を、大腸菌などの微生物で発現させる場合には、微生物中で複製可能なオリジン、プロモーター、リボソーム結合部位、DNAクローニング部位、ターミネーター等を有する発現ベクターに前記のポリヌクレオチドを組換えて発現ベクターを作成する。この発現ベクターで宿主細胞を形質転換すれば、目的のタンパク質を発現する形質転換体細胞を得ることができ、この形質転換体を培養すれば、その培養物から目的タンパク質を大量生産することができる。大腸菌用発現ベクターとしては、pUC系、pBluescript II、pET発現システム、pGEX発現システムなどが例示できる。

【0023】

さらに、ERRL1タンパク質を真核細胞で発現させる場合には、前記のポリヌクレオチドを、プロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位等を有する真核細胞用発現ベクターに挿入して組換えベクターを作成する。このベクターを真核細胞内に導入して培養すれば、目的とするタンパク質を発現する形質転換真核細胞を得ることができる。発現ベクターとしては、pKA1、pCDM8、pSVK3、pMSG、pSVL、pBK-CMV、pBK-RSV、EBVベクター、pRS、pYES2などが例示できる。真核細胞としては、ヒト胎児腎臓由来細胞HEK293T、サル腎臓細胞COS7、チャイニーズハムスター卵巣細胞CHOなどの哺乳動物培養細胞、あるいはヒト臓器から単離した初代培養細胞などが使用できる。出芽酵母、分裂酵母、カイコ細胞、アフリカツメガエル卵細胞なども使用できる。発現ベクターを細胞に導入するには、電気穿孔法、リン酸カルシウム法、リボソーム法、DEAEデキストラン法など公知の方法を用いることができる。

【0024】

形質転換細胞で発現させたERRL1タンパク質を単離精製するためには、公知の分離操作を組み合わせることができる。例えば、尿素などの変性剤や界面活性剤による処理、超音波処理、酵素消化、塩析や溶媒沈殿法、透析、遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、SDS-PAGE、等電点電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーなどが挙げられる。

【0025】

なお、細胞で発現したタンパク質は、翻訳された後、細胞内で各種修飾を受ける場合がある。したがって、修飾されたタンパク質もこの発明のタンパク質の範囲に含まれる。このような翻訳後修飾としては、N末端メチオニンの脱離、アセチル化、糖鎖付加、細胞内プロテアーゼによる限定分解、ミリストイル化、イソプレニル化、リン酸化、ユビキチン化、ADPリボシル化、メチル化などである。

【0026】

さらに、この発明のタンパク質には、他のタンパク質やペプチド等との融合タンパク質も含まれる。例えば、グルタチン-S-トランスフェラーゼ (GST) や緑色蛍光タンパク質 (GFP) との融合タンパク質である。また、精製等を容易にするためにFlagやHis tagをつけて発現させたERRL1タンパク質もこの発明のタンパク質の範囲に含まれる。

【0027】

以上の方法によって得られるERRL1タンパク質は、肥満や糖尿病治療薬の有効成分物質となるリード化合物を探索するためのターゲット分子として有用である。また、ERRL1タンパク質に対する抗体作製のための抗原としても使用することができる。

【0028】

発明(8)は、配列番号2のアミノ酸配列における一部連続配列からなるポリペプチドまたはオリゴペプチドである。すなわち、このポリペプチドまたはオリゴペプチドは、ERRL1タンパク質の活性部分を構成する任意領域に対応するタンパク質断片と同一のアミノ酸配列からなり、例えば、化学合成によってペプチドを合成する方法や、部分ポリヌクレオチドを用いて遺伝子工学的に作成する方法、あるいは前記発明(6)または(7)のERRL1タンパク質を適当なプロテアーゼで消化する方法等によって作成することができる。

【0029】

この発明(8)のポリペプチドまたはオリゴペプチドもまた、ERRL1タンパク質に対する抗体作製の抗原として使用することができる。

【0030】

発明(9)は、前記発明(6)のマウスタンパク質ERRL1と同一の機能を有するヒトタンパク質(h-ERRL1タンパク質)である。すなわち、ヒト受容体ERRに対するリガンド分子として機能し、さらに具体的には、配列番号2のアミノ酸配列と50%以上、好ましくは75%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相同性を有するヒトタンパク質である。このヒトタンパク質h-ERRL1は、発明(10)のヒトゲノム遺伝子の発現産物として取得することができる。この発明(10)のゲノムDNAは、配列番号1の塩基配列またはその一部配列からなる精製ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドをプローブとしてヒトのゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることによって単離することができる。また、発明(11)のヒト由来ポリヌクレオチドは、例えば、配列番号1に基づいて合成したプローブを用いてヒトcDNAライブラリーをスクリーニングする方法や、配列番号1に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプライマーとして、ヒト細胞から単離したmRNAを鋳型とするRT-PCR法によって得ることができる。

【0031】

発明(12)は、前記のERRL1タンパク質を認識するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり、ERRL1タンパク質のエピトープに結合することができる全体分子、およびFab、F(ab')₂、Fv断片等が全て含まれる。このような抗体は、前記の精製ERRL1タンパク質やペプチドを抗原として用いて動物を免疫した後、血清から得ることができる。あるいは、上記の真核細胞用発現ベクターを注射や遺伝子銃によって、動物の筋肉や皮膚に導入した後、血清を採取することによって作製することができる。動物としては、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ニワトリなどが用いられる。免疫した動物の脾臓から採取したB細胞をミエローマと融合させてハイブリドーマを作製すれば、モノクローナル抗体を産生することができる。

【0032】

このようにして得た抗体は、例えばERRL1タンパク質の発現を測定するために使用することができる。

【0033】

発明(13)のトランスジェニックマウスは、ERRL1タンパク質をコードする前記

ポリヌクレオチドを導入した全能性細胞を個体発生させて得られるマウスおよびその子孫動物であって、細胞染色体中に上記ポリヌクレオチドを保有し、体細胞において外来性のERRL1タンパク質を高レベルで産生することを特徴とするマウスである。この発明のトランスジェニックマウスは、公知のトランスジェニック動物作製法（例えば、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77;7380-7384, 1980）に従って作成することができる。すなわち、前記のポリヌクレオチド（以下、「導入遺伝子」と記載することがある）をマウスの全能性細胞に導入し、この細胞を個体へと発生させ、体細胞のゲノム中に導入遺伝子が組み込まれた個体を選別することによって目的とするトランスジェニックマウスを作製することができる。

【0034】

また、導入遺伝子には、その発現を制御するためのプロモーター配列やエンハンサー配列を連結する。このプロモーター／エンハンサー配列の選択によって、ERRL1タンパク質を全身性に発現させることもでき、また特定の組織で選択的に発現させることもできる。

【0035】

このような導入遺伝子は、前記のポリヌクレオチドやプロモーター／エンハンサー配列を、導入遺伝子の発現調節に有効な位置関係となるように環状DNAベクターに挿入連結することによって構築することができる。そして、このベクターDNAを制限酵素で切断した後、ベクター部分を除去したものを全能性細胞に導入する。

【0036】

遺伝子を導入する全能性細胞としては、受精卵や初期胚を用いることができる。また全能性細胞への遺伝子導入法としては、トランスジェニック動物個体の産出高率や次代への導入遺伝子の伝達効率を考慮した場合、DNAの物理的注入（マイクロインジェクション）法が最適である。

【0037】

遺伝子を注入した受精卵は、次に仮親の卵管に移植され、個体まで発生し出生した動物を里親につけて飼育させたのち、体の一部（例えば、尾部先端）からDNAを抽出し、サザン解析やPCR法により導入遺伝子の存在を確認する。導入遺伝子

の存在が確認された個体を初代 (Founder) とすれば、導入遺伝子はその子 (F1) の50%に伝達される。さらに、このF1個体を野生型動物または他のF1動物と交配させることにより、2倍体染色体の片方 (ヘテロ接合) または両方 (ホモ接合) に導入遺伝子を有する個体 (F2) を作成することができる。

【0038】

このようにして作出されたトランスジェニックマウスは、全ての体細胞または特定の組織においてERRL1タンパク質を過剰発現し、後記実施例に示したように、摂食亢進性でありながら痩身であり、またエネルギー消費が顕著に高いというユニークな特徴を有している。このようなトランスジェニックマウスは、例えば後記のスクリーニング方法において使用することができる。

【0039】

発明(14)は、肥満および／または糖尿病の治療薬の有効成分物質をスクリーニングする方法である。具体的には、細胞または動物個体に候補物質を作用させ、以下の基準：

- (a) リガンド因子ERRL1の発現量を増加させる；
- (b) 核内受容体ERRの発現量を増加させる；
- (c) ERRL1とERRの結合を促進させる；
- (c) MCAD遺伝子産物の発現量を増加させる

のいずれか1以上を満たす候補物質を目的物質として特定することを特徴とする。

【0040】

この発明(14)の方法において、「候補物質」とは、未知および既知の有機または無機化合物、タンパク質、ペプチド、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド等を含む。「細胞」とは、株化された動物細胞、または動物個体（好ましくはマウス）の組織から単離し、培養条件下に適切に保たれた細胞である。株化細胞としては、3T3-L1細胞株等の脂肪細胞を例示することができる。すなわち、後記実施例に示すように、ERRL1タンパク質の発現はこの脂肪細胞の分化中に敏感に反応するため、目的物質の探索のための好ましい細胞である。あるいは、株化動物細胞や細菌（大腸菌等）にERRL1 cDNAおよび／またはERR cDNAをトランスフ

エクトした細胞であってもよい。この場合、ERR cDNAはERR1、ERR2またはERR3のいずれか1つを採用することができる。また、動物個体から単離した細胞としては、ERRL1タンパク質が高度に発現されているBAT、心臓、骨格筋または腎臓等から単離した細胞を例示することができる。一方、「動物個体」とは、好ましくはマウスであり、この動物個体に候補物質を投与（全身または局所）、もしくは摂食ないしは摂飲させ、その動物個体の組織または細胞における前記基準(a)～(d)を測定する。その際に、発明(13)のトランスジェニックマウスを正の対照とすることができる。すなわち、このトランスジェニックマウスはERRL1タンパク質を過剰発現し、その結果として受容体ERRおよびMCAD遺伝子を高度に発現しているため、候補物質を投与した野性型マウスがこのトランスジェニックマウスと同定度に前記基準(a)～(d)の1つ以上を満たすか否かを測定することによって、候補物質の効果を判定することができる。また、この動物個体を対象とする場合には、高脂肪食の摂取、身体運動負荷等の処置を行うことや、あるいは摂食量や体重、エネルギー消費等を判定基準に加えることもできる。

【0041】

前記の基準(a)～(d)の判定は、それぞれの遺伝子発現をその転写産物（mRNAやタンパク質）の量を公知の方法によって測定することによって行うことができる。例えば定量的なPT-PCR法や、ノーザンブロッティング、それぞれの発現産物に対する抗体を用いたウエスタンブロッティング法等である。

【0042】

以上の方法によって特定された有効成分物質を用いることによって、新規の肥満治療薬、糖尿病治療薬の開発が可能となる。すなわち、このような薬剤は、第1にはERR1を直接活性化するもの、第2にはERRL1発現を増加させるもの、第3にはERRL1とERRの間の相互作用を増加させるものである。これらのタイプの薬は「運動模倣薬」と呼称することができ、副作用が無いかまたは最少と期待される。すなわち、運動は肥満や糖尿病に対抗するよく知られた最も安全な方法であるからである。

【0043】

以下、実施例を示してこの出願の発明についてさらに詳細かつ具体的に説明す

るが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

【0044】

【実施例】

1. 方法

1.1. データベース探索

EST相同性探索は、BLASTプログラム (Altshul, S.F. et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997) を使用して行った。

1.2. RNA分析

文献 (Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 7.2-7.87, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989) の記載に従ってノーザン・ブロット分析を行った。MCAD (Genbank accession No. U07159) のcDNAプローブ、PRC (BC013720)、ERR1 (U85259)、ERR2 (S82458)、ERR3 (AF117254)、ACC2 (AF290178)、UCP-1 (U63419)、UCP-3 (AF032902)、CS (056479)、およびLDH (X51905) はRT/PCRによって得た。

1.3. 転写活性分析

トランスフェクションおよびレポーター分析は、文献 (Takada, I. et al., Mol. Endocrinol. 14:733-740, 2000) の記載に従って行った。すなわち、GAL4結合配列の4コピーを含むレポーター遺伝子 ((UAS)₄-Luc) を、GAL4のDNA結合領域と核内受容体のリガンド結合領域を融合したキメラ受容体の発現ベクター (pCMX-GAL4-核内受容体) の存在または非存在下でCV-1細胞にトランスフェクションして、GAL4-核内受容体融合タンパク質の転写活性を測定した (Takada, I. et al., Mol. Endocrinol. 14:733-740, 2000)。すべてのルシフェラーゼ活性を共トランスフェクトされた β ガラクトシダーゼ活性によって正常化した。次に述べる核内受容体のリガンド結合ドメインに融合したGAL4のアミノ酸1-147が使用された。マウスAR (アミノ酸607-899、Genbank accession番号X59592)、ヒトER α (a. a. 251-595, X03635)、ヒトGR (a. a. 489-777, M10901)、ラットFXR (a. a. 190-469, U18374)、ヒトRAR α (a. a. 126-432, X06538)、ヒトRXR α (a. a. 222-462, X52773)、マウスPPAR α (a. a. 156-468, X57638)、ヒトPPAR γ 1 (a. a. 176-478, L40904)、ヒトPXR (a. a. 110-434, AF084645)、ヒトERR1 (a. a. 147-

422, L38487)、ヒトERR2 (a.a. 171-433, X51417)、ヒトERR3 (a.a. 173-436, AF058291)、ヒトHNF4 α (a.a. 125-465, X76930)、ヒトNOR (a.a. 361-626, D78579)、ヒトNURR1 (a.a. 264-535, S77154)、ヒトROR α 1 (a.a. 140-523, U04897)、ヒトSF1 (a.a. 64-461, U76388)、ヒトCOUP (a.a. 156-423, X12795)、ヒトTR2-11 (a.a. 149-603, M29960)、ヒトRevErbA (a.a. 199-614, M24898)。なお、それぞれの核内受容体の省略名称はGenbankファイルを参照している (Giguere, V., Endocr. Rev. 20:689-725, 1999)。GAL4-核内受容体の発現プラスミドは、K. Umesono博士から供与された。マウスPGC-1 cDNAは、マウスの胎児cDNAライブラリーをスクリーニングして得た。ヒトERR1、2、3の完全長のcDNAは、RT/PCRによって得た。増幅産物をpCAGGSおよびpCMX発現ベクター中にサブクローニングし、シークエンシングによって確認した。

1.4. タンパク質相互作用分析

ERR1およびERR3をGSTとを融合したコンストラクト (発現ベクター) を、文献 (Li, B. et al., Nat. Med. 6:1115-1120, 2000) の記載に従い、¹⁵S-ERRL1 (TNT、プロメガ) と共にインキュベートした後、洗浄し、結合した¹⁵S-ERRL1をSDS-PAGEで分離後、オートラジオグラフィーで定量した。

1.5. 安定細胞系

フェニックス293細胞 (University of Stanford, G.P. Nolan博士から贈呈) を使用してレトロウイルスをパッケージングした (Grignani, F. et al., Cancer Res. 58:14-19, 1998)。ERR1、ERR3およびGFP (コントロール) のcDNAを含むpLNCX由来の発現プラスミド (Clontech) およびERRL1、PGC-1またはGFPのcDNAを含むpMX由来の発現プラスミド (Misawa, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 97:3062-3066, 2000) (pMX: 東京大学 T. Kitamura博士から贈呈) は、メーカーの指示書に従って使用した。

1.6. トランスジェニックマウスの作出

pCAGGS (Niwa, H., Gene 108:193-200, 1991) にERRL1 cDNAをクローニングし、トランスジーン (図4a) を切り取り、精製した (2ng μ l⁻¹)。BDF1オスとかけ合わされたBDF1メス (C57BL/6xDBA/2) から受精卵を回収し、標準法 (Gordon, J., in Guide to Techniques in Mouse Development, (eds Wassarman, P.M. &

DePamplilis, M.L., 747-771, Academic press, San Diego, 1993)によりトランスジーンを微量注入した。マウスの世話は発明者が属する施設のガイドラインに従って行った。

1.7. 高脂肪食

常用食 (Oriental Yeast Inc., 東京、日本) あるいはカゼイン (20% wt/wt)、 α コーンスターチ (30.2%)、蔗糖 (10%)、ラード (25%)、コーン油 (5%)、ミネラル (3.5%)、ビタミン (1%)、セルロース粉 (5%) およびD、Lメチオニン (0.3%) を含む高脂肪食 (Aoki, N. et al., Obesity Res. 1:126-131, 1993) をマウスに与えた。

1.8. エネルギー消費の測定

酸素消費および二酸化炭素の生成を、質量分析器上とコンピューターからなる間接カロリーメータシステムを使用して決定した (Komenani, N. et al., J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo) 41:395-407, 1995)。マウスを、それぞれガスマススペクトロメーター (WSMR-1400、Westron、千葉、日本) に繋がれた開放回路型プラスチック呼吸実験箱 (24(46(18 cm) に入れた。気流は2 l/min⁻¹で制御した。ガス分析は10:00から次の日の9:00まで実施した。サンプルを、部屋の空気を基準として、2分毎に続けてモニターした。移動活動は、各呼吸器の下に設置されたAnimex-III (Shimadzu、京都、日本) によって10分ごとに自動的に記録した。エネルギー消費は文献 (Komenani, N. et al., J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo) 41:395-407, 1995) の記載に従って計算した。

1.9. KKAYマウス

KKAYマウスは、Clea Japan Inc. (東京) から購入した。

1.10. 屋内ランニング練習機 (トレッドミル)

運動実験のため、週齢8週間のオスマウス (C57BL/6) をトレッドミルで走らせた (10%の上り坂、15 m/min⁻¹)。運動後、指示された時間でマウスを屠殺し、骨格筋 (大腿四頭筋) を単離してRNA分析した。

1.11. 統計学的分析

二つの実験グループから入手したデータの統計学的比較は、スチューデントt-検定を使用して行った。多数のグループからのデータは、一方向分散分析 (AN

OVA) によって比較し、各グループとその他のグループとの比較は、フィッシャーの制約付最小有意差 (PLSD) 検定 (Statview 4.0、Abacus Concepts) で行った。P<0.05またはP<0.01を統計学的有意差とした。

2. 結果

2.1. ERRL1 cDNAのクローニングとその特徴

PCG-1関連分子についてEST (expression sequence tags) を探索した結果、PCG-1と極めて高い相同性を有するESTを見出し、このESTを含む完全長cDNAを単離した。このcDNAは、約3.4kbからなり (配列番号1)、1,014個のアミノ酸配列 (配列番号2) からなるタンパク質をコードしている。このタンパク質は、ERR (後で詳述する) の「タンパク質リガンド」としての特質をもとにERRL1 (ERR ligand 1の略) と命名した。なお、LinらはPGC-1 β と呼ばれるPGC-1相同体のクローニングを報告しているが (Lin, J. et al., J. Biol. Chem. 277:1645-1648, 2002)、このPGC-1 β は、ERRL1と唯一アミノ酸が異なっている (配列番号2の260番目Leuが、PGC-1 β ではPro)。ERRL1およびPGC-1は、ERRL1の中央にみられる特有の領域を除いては、高度のアミノ酸同一性を示した。相同領域は、配列同一性および推定される機能的特質に基づいて5つのドメインに分けられた (図1)。ERRL1のN末端領域 (アミノ酸1-282) は、二つのLXXLLモチーフ、すなわち核内受容体に対して結合すると思われるモチーフ (Torchia, J. et al., Nature 387:677-684, 1997; Herry, D.M., et al., Nature 387:733-736, 1997) を含み、PGC-1と41%の同一性を持つ。第二番目の領域 (アミノ酸283-578) は、ERRL1に特有で、E (グルタミン酸) 繰り返しを含み、LXXLLモチーフを一つ含む。第三番目の領域 (アミノ酸579 - 665) は高度に保存 (47%のアミノ酸同一性) されている。第四番目の領域 (アミノ酸666 - 883) は保存性が低く (22%のアミノ酸同一性)、PGC-1中の長いSRドメインと比較すると非常に短いセリン - アルギニン (SR) に富むドメイン (tacke, R. & Manley, J.L. Curr. Opin. Cell Biol. 11:358-362, 1999) をERRL1中に含んでいる。C末端ドメイン (アミノ酸884-1014) は、推定されるRNA結合ドメイン (Krecic, A.M. & Swanson, M.S., Curr. Opin. Cell Biol. 11:363-371, 1999) を持ち、高度に保存されている (52%アミノ酸同一性)。

2.2. ERRL1およびERR間の類似発現パターン

成熟マウスの異なる組織におけるERRL1の発現パターンを調べた。長さ約10kbおよび4kbの二つのERRL1 mRNAを観察した。ERRL1 mRNAは、脳、BAT、心臓、骨格筋に豊富に存在しており、また腎臓、胃、白色脂肪組織 (WAT) においても検出された。先の報告 (Puigserver, P. et al., Cell 92:829-839, 1998) と一致して、寒冷ストレスに曝した後、PGC-1発現がマウスのBATで上昇したが、ERRL1 mRNAはこのストレスによってほんのわずかに発現増加するのみであった。

【0045】

さらにまた、ERRL1の発現パターンは、ERR1の発現パターンと非常によく類似しており (Sladek, R. et al., Mol. Cell. Biol. 17:5400-5409, 1997および図2)、つまり、両mRNAは、細胞エネルギーの源である脂質を利用できる組織、例えばBAT、心臓、骨格筋および腎臓で高度に発現されている (図2A)。なお、ERR2 mRNAの発現は検出されなかったが、これは以前の研究報告 (Giguere, V. et al., Nature 331:91-94, 1988) と一致している。

【0046】

次に、3T3-L1細胞が脂肪細胞へ分化する間にERRL1発現が増加するかどうかを調べた。確かに、ERRL1 mRNAは3T3-L1前脂肪細胞中では非常に低レベルで存在しており、脂肪細胞分化中に著しく増加した。これに対して、PGC-1および別のPGC-1関連分子であるPRC (Andersson, U. & Scarpulla, R.C. Mol. Cell. Biol. 21:3738-3749, 2001) のmRNAは、この脂肪細胞分化中においては低レベルのままであった (図2B)。ERRL1 mRNAが同様に増加することが、別の前脂肪細胞株の10T1/2から分化した成熟脂肪細胞 (Smas, C.M. & Sul, H.S. Biolchem. J. 309:697-710, 1995) においても観測された (図2C)。また、ERR1およびそのターゲットであるMCADの発現の様子がERRL1と非常に類似していたが (図2B、C)、ERR2 mRNAおよびERR3 mRNAの発現は、それらの細胞では検出されなかった。これらの結果から、ERRL1は脂質代謝等の成熟脂肪細胞関連機能における遺伝子調節に関与することが示唆される。

2.3. 汎核内受容体アゴニストとしてのPGC-1

ERRL1がPPAR γ の共活性因子として機能できるかどうかを、PGC-1を共活性因子

のコントロールとして調べた。予想に反して、ERRL1がPPAR γ によって媒介される転写を活性化できることを示す証拠を見つけることができなかった。対照実験において、親油性リガンドを外部から加えなくても、PGC-1が単純に発現することによってPPAR γ により媒介される転写が劇的に活性化されることが確認された。PGC-1は、PPAR γ ばかりでなく、数種の他の核内受容体とも物理的に相互作用することが知られている (Puigserver, P. et al., Cell 92:829-839, 1998; Yoon, J.C. et al., Nature 413:131-138, 2001; Tcherepanova, I. et al., J. Biol. Chem. 275:16302-16308, 2000; Vega, R.B. et al., Mol. Cell. Biol. 20:1868-1876, 2000; Delerive, P. et al., J. Biol. Chem. 277:3913-3917, 2002)。更に、冷氣に曝されたり (Puigserver, P. et al., Cell 92:829-839, 1998)、絶食 (Yoon, J.C. et al., Nature 413:131-138, 2001; Lehman, J.J. et al., J. Clin. Invest. 106:847-856, 2000) 状態下等の特定の環境的变化によりPGC-1が誘導される事がわかっている。このような観察知見により、PGC-1の単なる発現が多くの核内受容体の経路を活性化する可能性があることが高まった。予想されるこのような特徴は、核内受容体の古典的な親油性リガンドに類似している。そこで、このような可能性の検証に取り組むために、そのDNA結合ドメインをGAL4 DNA結合ドメインに置き換えた核内受容体を使用した。この置き換えによって、転写活性の様相を、(UAS) $_4$ -Luc等の同一のレポーター (遺伝子) で簡単に比較することができる。実際、PGC-1は、orphan HNF4 α 、SF1、ERRを含む多数の核内受容体を経て転写を活性化することができた。中でもPGC-1はHNF4 α をもっとも強力に活性化できた。これは最近の報告 (Yoon, J.C. et al., Nature 413:131-138, 2001) と一致する。PGC-1は続いて、ER α 、SF1、ERR、PPAR、PXR、RAR α およびRXR α を活性化した (図3A)。これらの観察知見により、PGC-1は、汎用または広範な核内受容体アゴニストとして機能することが確認された。

2.4. ERRタンパク質のリガンドとしてのERRL1

前記と同じGAL4融合核内受容体セットを使用して、ERRL1の潜在パートナーを探索し、ERRに媒介される転写をERRL1が特異的に活性化できることを見出した。ERR3は、ERRL1によって最も強力に活性化され、その次にERR1そしてERR2が活性化された (図3B)。そこで、完全長のERRに対するERRL1の転写活性化特性につい

てテストした。上記実験と一致して、ERRL1は投与量に依存して、MCAD遺伝子プロモーター (Sladek, R. et al., Mol. Cell. Biol. 17:5400-5409, 1997; Vega, R.B. & Kelly, D.P. J. Biol. Chem. 272:31693-31699, 1997) からのERR応答性配列 (ERRE) を経て行われる完全長ERR3および完全長ERR1に媒介される転写を活性化した (図3C)。前者は後者と比べてはるかに強く活性化された。

【0047】

次にERRL1が物理的にERRと相互作用するかどうかを、細菌を使って生成したグルタチオンSトランスフェラーゼ融合ERR (GST-ERR) とインビトロで翻訳されたERRL1を用いたインビトロ結合分析によってテストした。GST単独ではなくマトリックスに結合したGST-ERR1およびGST-ERRは、放射性標識されたERRL1を有効に保持した (図3D)。また、先の報告 (Sladek, R. et al., Mol. Cell. Biol. 17:5400-5409, 1997; Vega, R.B. & Kelly, D.P. J. Biol. Chem. 272:31693-31699, 1997) と同様に、ERRが放射性標識されたMCAD ERREオリゴヌクレオチドと結合したことをゲル移動度シフト分析で確認し、またERR-DNA複合体がERRL1タンパク質を添加したことによってスーパーシフトしたことを確認した。親油性ホルモンは、タンパク質合成と結合反応のどちらにおいても何も加えていないことから、これらの結果よりERRL1およびERRが直接ERRターゲットプロモーターDNAと相互作用できることが示唆された。

【0048】

次に、10T1/2細胞株においてERRL1およびERRを発現させ、ERRL1がMCAD遺伝子発現をERRを介して活性化するかどうかについて調べた。GFP (コントロール)、ERR1、ERR3、ERRL1またはPGC-1をコードするDNAを含んでいる組換えレトロウイルスを組み合わせて10T1/2細胞に感染させた。ノーザン・ブロット分析を行い、各細胞で導入された遺伝子の発現を確認した (図3E)。ERR1またはERR3のいずれかが単独に発現すると、GFP単独を感染させた細胞における発現と較べて、MCAD mRNAレベルは中程度に増加した。ERR1とERRL1の両者またはERR3とERRL1の両者を共に発現させると、MCAD mRNAレベルはさらに顕著に増加した (図3E)。これらの結果をまとめると、ERRL1はERRの「タンパク質リガンド」として機能し、少なくとも培養細胞中では、ERRに媒介される転写を活性化させる事が確認された。

2.5. ERRL1マウスの作成

上昇したERRL1発現の影響をin vivoで調べるため、ERRL1トランスジェニックマウスを作成した。これらのマウスは活性化されたERR媒介転写によって誘導されるマウスの表現型に類似したものとなると予想される。サイトメガロウイルス極初期エンハンサー (CAGプロモーター) を持つチキン β アクチン・プロモーターを使用し、マウス個体内でのマウスERRL1導入遺伝子の発現を促した (図4A)。マウスの尾部 (tail) DNAのサウザン・プロット分析を行い、導入遺伝子のコピー数を決定した (図4B)。

【0049】

ERRL1導入遺伝子の発現を、ERRL1マウスおよびコントロールの8週齢、同腹のマウスの組織から単離されたRNAについてノーザン・プロット分析を行って評価した (図4c)。導入遺伝子特異的プローブ (プローブ2、図4A) を使用した場合、4kbの単一バンドのみが検出された。CAGプロモーターは、どの組織中でも強活性を示したと報告されている (Niwa, H. et al., Gene 108:193-200, 1991)。しかしながら意外にも、このプロモーターを使用した結果、脳、BAT、心臓、骨格筋、および睾丸等のいくつかの限られた組織中でERRL1導入遺伝子の高い発現レベルが観察されたが、肝臓中では発現が観察されなかった (図4C)。これらの発現プロファイルは、内在性ERRL1発現パターンと比較的良好に一致していた (図4C)。この観察知見は、ERRL1発現に極めて重要な組織特異的調整cis配列が、このコンストラクト中のERRL1 cDNA中に存在している可能性を示唆している。

【0050】

in vitroのデータから予測されるように、ERRL1マウスの骨格筋でのERRL1発現の上昇 (図4D) が、in vivoでのMCAD RNA発現を上昇させた。これに対してERRL1の発現の上昇は、アセチルCoAカルボキシラーゼ2 (ACC2) (Abu-Elheiga, L. et al., Science 291:2613-2616, 2001) および脱共役タンパク質3 (UCP3) (Clapham, J.C. et al., Nature 406:415-418, 2000) 遺伝子の発現には影響しなかった。

2.6. ERRL1マウスは摂食亢進性であるが痩身である

ERRL1マウスに見られた明白な表現型は痩せであった。これは脂肪酸の β 酸化

の増加から予測できるものとよく一致していた。この表現型は、マウスを高脂肪食 (Aoki, N. et al., Obesity Res. 1:126-131, 1993) で飼育した時にもっと顕著であった。9週齢目の野生型コントロールマウス (雄、n=6) およびERRL1マウス (雄、n=6) に高脂肪食を自由に与え、毎週、各マウスの食糧消費量および体重を測定した。ERRL1マウスはコントロールマウスよりも有意に多くの食糧を消費した (図5A)。しかしながら、トランスジェニックマウスの体重は、コントロールマウスよりも飼育前および飼育期間中には15から25%少なく (図5B)、脂肪組織中には少ししか脂肪が蓄積されていなかった (図5C)。ERRL1マウス中の精巢上体のWATは $0.92 \pm 0.28\text{g}$ であった。これと比べてコントロールマウスは $2.0 \pm 0.30\text{g}$ であった (図5Dおよび表1)。これに対して、肝臓の重さは、著しく違うことはなかった (ERRL1マウス： $1.23 \pm 0.06\text{g}$ 、コントロールマウス： $1.4 \pm 0.08\text{g}$)。トランスジェニックマウスの脂肪細胞はコントロールマウスより小さかった (ERRL1マウスの脂肪細胞の平均直径： $25.1 \pm 1.1\mu\text{m}$ 、コントロールマウス： $54.5 \pm 2.2\mu\text{m}$ 、図5E、F)。

【0051】

それらマウスの血液を採集し、血清成分を生化学的に分析した (表1)。脂肪質量の低下は、結果として血清中のレプチンの量の低下を招いた (ERRL1マウス： $5.9 \pm 3.5\text{ ng ml}^{-1}$ 、コントロールマウス： $25.0 \pm 6.6\text{ ng ml}^{-1}$)。レプチンは、WATから分泌される抗食欲ホルモンであるため (Friedman, J.M. Nature 404:632-634, 2000)、ERRL1マウスで観察されたレプチンの低下レベルはそれらが摂食亢進性であるという観測と一致している。さらに、高脂肪食を与えたコントロールマウスと比べるとトランスジェニックマウスではインシュリンのレベル低下が観察された。高脂肪食を与えた場合、マウスは、たとえ血漿インシュリンが高い濃度であっても通常ブドウ糖の取りこみに抵抗する状態になる (Li, B. et al., Nat. Med. 6:1115-1120, 2000)。つまりインシュリン抵抗性と呼ばれる同様の状態は、肥満または2型糖尿病患者によく見られる (Lovejoy, J.C. Curr. Atheroscle. Rep. 1:215-220, 1999)。ERRL1マウスにおいて観察された体重低下およびインシュリンレベルの低下は、ERRL1の発現増加が肥満に抵抗でき、またインシュリン抵抗性を克服することによってたとえ高カロリー食をとったとして

も、糖尿病状態の改善に貢献できるということを示している。

2.7. ERRL1マウスのエネルギー消費の増加

ERRL1マウスにおけるエネルギー消費を調べた。それぞれマウスが入った呼吸分析用の試験槽でガス分析を行い、エネルギー消費を計算した。その結果、12週齢のERRL1マウスのエネルギー消費は、コントロールマウスよりも顕著に高いことが確認された（休息時エネルギー消費：ERRL1マウス： 126.3 ± 3.8 、コントロールマウス： $101.5 \pm 6.7 \text{ kcal day}^{-1} \text{ kg}^{-0.75}$ 、 $P < 0.05$ 、各グループにつき $n=6$ 、全エネルギー消費：ERRL1マウス： 211.2 ± 10.7 、コントロールマウス： $155.9 \pm 7.8 \text{ kcal day}^{-1} \text{ kg}^{-0.75}$ 、 $P < 0.01$ 、各グループにつき $n=6$ ）（図5G、H）。しかしながら、移動活動は著しく変化することにはなかった（ERRL1マウス： $7,338 \pm 700$ カウント、コントロールマウス： $5,338 \pm 390$ カウント、データは、24時間にわたるすべての移動の計を示す）。これらの結果により、コントロールマウスおよびERRL1マウス間の体重差は、エネルギー消費の差にほぼ起因していることが確認された。

2.8. ERRL1発現が遺伝的にプログラムされた肥満に対抗できる

ERRL1マウスおよびKKAyマウスを交配させて、KKAyマウスの肥満表現型がERRL1の発現増加により抑制されるかどうかを調べた。KKAyマウスはAyの突然変異をもっており、これによってアグーチの毛皮カラータンパク質の異所性発現を招き、優性的な遺伝性シンドロームである肥満および黄色毛皮化を引き起こす（Siracusa, L.D., Trends Genet. 10:423-428, 1994）。アグーチタンパク質は、中枢神経系において食欲の抑制性受容体として働いていると考えられているメラノコルチン受容体のアンタゴニストとして働いている（Friedman, J.M. Nature 404:632-634, 2000；Siracusa, L.D., Trends Genet. 10:423-428, 1994）。KKAyオスをERRL1メスと交配させて繁殖させ、子孫を毛皮の色（黄色：KKAy(+)、黒：KKAy(-)）およびERRL1トランスジェン発現によって選別した。各グループの体重を比較すると、ERRL1トランスジェンKKAy(+)およびKKAy(-)マウスにみられる体重の増加を抑制し（図6A、B）、ERRL1発現の増加によって、遺伝性の肥満を抑制できることが証明された。

2.9. 身体的運動後、ERRL1の発現が誘導される

ERRL1発現がin vivoで誘導される条件を探索した。数多くの実験を行った後、マウスが強制的に屋内ランニング練習機上で運動させられた時、ERRL1発現が骨格筋で誘導されることを見出した。ERRL1およびMCAD mRNA両者の発現は運動によって著しく増加した(図7A)。加えてエネルギー消費に関与するクエン酸シンターゼ(CS)および乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)のmRNAが誘導された。ERRL1レベルの増加は、MCAD、CSおよびLDH発現の増加と密接に相関していた。まったく同じMCAD、CSおよびLDH発現の増加が、ERRL1マウスで観察された(図4Dおよび7B)。

3. 考察

以上の結果から、ERRL1はERRの「タンパク質リガンド」として機能し、in vivoでのエネルギー消費をコントロールしていること、およびERRL1発現レベルは、身体的運動後に典型的に見られるように、ある特定の環境変化に反応して調整されることが確認された。

【0052】

これらの結果は、身体的運動がどういうメカニズムで抗肥満および抗糖尿病機能に貢献するのかについての長期にわたる質問に対して明快な答えを提供する。すなわち身体的運動は骨格筋中でERRL1の発現レベルを上昇させ、これが今度はERRタンパク質リガンドとして機能し、MCAD遺伝子発現を活性化し、脂肪酸の β 酸化の活性化を導いている。脂肪酸酸化が増加すると、結果として蓄積される脂肪が少なくなる。この事実は、運動を通して達成される生理的状态である。

【0053】

また以上の結果は、ERRL1やERRの薬理的活性化によって、通常またはそれ以上のカロリー摂取を維持したままでの体重減少が可能になることを明確に示すものである。

【0054】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、核内の孤児受容体ERRに対する新しいリガンド分子ERRL1と、その遺伝子操作材料、並びにこのリガンド分子ERRL1や、リガンド分子ERRL1と受容体ERRとの相互作用を指標として肥満

や糖尿病の治療薬成分をスクリーニングする方法が提供される。

【 0 0 5 5 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> A ligand molecule for a intranucleus receptor ERR, and
a method of drug screening

<130> NP02186

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3345

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (32)..(3076)

<400> 1

ctccgccgca cgctgcagcc gcggctggaa g atg gcg ggg aac gac tgc ggc 52
Met Ala Gly Asn Asp Cys Gly
1 5

gcg ctg ctg gat gaa gag ctc tcg tcc ttc ttc ctc aac tat ctc tct 100
Ala Leu Leu Asp Glu Glu Leu Ser Ser Phe Phe Leu Asn Tyr Leu Ser
10 15 20

gac acg cag ggt ggg gac tct gga gag gaa cag ctg tgt gct gac ttg 148
Asp Thr Gln Gly Gly Asp Ser Gly Glu Glu Gln Leu Cys Ala Asp Leu
25 30 35

cca gag ctt gac ctc tcc cag ctg gac gcc agt gac ttt gac tca gcc 196
Pro Glu Leu Asp Leu Ser Gln Leu Asp Ala Ser Asp Phe Asp Ser Ala
40 45 50 55

acg tgc ttt ggg gag ctg cag tgg tgc ccg gag acc tca gag aca gag 244
Thr Cys Phe Gly Glu Leu Gln Trp Cys Pro Glu Thr Ser Glu Thr Glu
60 65 70

ccc agc cag tac agc ccc gat gac tcc gag ctc ttc cag att gac agt 292
Pro Ser Gln Tyr Ser Pro Asp Asp Ser Glu Leu Phe Gln Ile Asp Ser
75 80 85

gag aat gaa gct ctc ttg gct gcg ctt acg aag acc ctg gat gac atc 340
Glu Asn Glu Ala Leu Leu Ala Ala Leu Thr Lys Thr Leu Asp Asp Ile
90 95 100

ccc gaa gac gat gtg ggg ctg gct gcc ttc cca gaa ctg gat gaa ggc 388

Pro Glu Asp Asp Val Gly Leu Ala Ala Phe Pro Glu Leu Asp Glu Gly
105 110 115

gac aca cca tcc tgc acc cca gcc tca cct gcc ccc tta tct gca ccc 436
Asp Thr Pro Ser Cys Thr Pro Ala Ser Pro Ala Pro Leu Ser Ala Pro
120 125 130 135

ccc agc ccc acc ctg gag agg ctt ctg tcc cca gcg tct gac gtg gac 484
Pro Ser Pro Thr Leu Glu Arg Leu Leu Ser Pro Ala Ser Asp Val Asp
140 145 150

gag ctt tca ctg cta cag aag ctc ctc ctg gcc aca tcc tcc cca aca 532
Glu Leu Ser Leu Leu Gln Lys Leu Leu Leu Ala Thr Ser Ser Pro Thr
155 160 165

gca agc tct gac gct ctg aag gac ggg gcc acc tgg tcc cag acc agc 580
Ala Ser Ser Asp Ala Leu Lys Asp Gly Ala Thr Trp Ser Gln Thr Ser
170 175 180

ctc agt tcc aga agt cag cgg cct tgt gtc aag gtg gat ggc acc cag 628
Leu Ser Ser Arg Ser Gln Arg Pro Cys Val Lys Val Asp Gly Thr Gln
185 190 195

gat aag aag acc ccc aca ctg cgg gct cag agc cgg cct tgt acg gaa 676
Asp Lys Lys Thr Pro Thr Leu Arg Ala Gln Ser Arg Pro Cys Thr Glu
200 205 210 215

ctg cat aag cac ctc act tcg gtg ctg ccc tgt ccc aga gtg aaa gcc 724
Leu His Lys His Leu Thr Ser Val Leu Pro Cys Pro Arg Val Lys Ala

220

225

230

tgc tcc cca act ccg cac ccg agc cct cgg ctc ctc tcc aaa gag gag 772

Cys Ser Pro Thr Pro His Pro Ser Pro Arg Leu Leu Ser Lys Glu Glu

235

240

245

gag gag gag gtg ggg gag gat tgc cca agc cct tgg ctg act cca gcc 820

Glu Glu Glu Val Gly Glu Asp Cys Pro Ser Pro Trp Leu Thr Pro Ala

250

255

260

tcg ccc caa gac tcc cta gca cag gac acg gcc agc ccc gac agt gcc 868

Ser Pro Gln Asp Ser Leu Ala Gln Asp Thr Ala Ser Pro Asp Ser Ala

265

270

275

cag cct ccc gag gag gat gtg agg gcc atg gta cag ctc att cgc tac 916

Gln Pro Pro Glu Glu Asp Val Arg Ala Met Val Gln Leu Ile Arg Tyr

280

285

290

295

atg cat acc tac tgc ctg cct cag agg aag ctg ccc caa cgg gcc cca 964

Met His Thr Tyr Cys Leu Pro Gln Arg Lys Leu Pro Gln Arg Ala Pro

300

305

310

gag cca atc ccc cag gcc tgc agc agc ctc tcc agg cag gtt caa ccc 1012

Glu Pro Ile Pro Gln Ala Cys Ser Ser Leu Ser Arg Gln Val Gln Pro

315

320

325

cga tcc cgg cat ccc ccc aaa gcc ttc tgg act gag ttc tct atc cta 1060

Arg Ser Arg His Pro Pro Lys Ala Phe Trp Thr Glu Phe Ser Ile Leu

330

335

340

agg gaa ctt ctg gcc caa gat atc ctc tgt gat gtt agc aag ccc tac 1108

Arg Glu Leu Leu Ala Gln Asp Ile Leu Cys Asp Val Ser Lys Pro Tyr

345

350

355

cgc ctg gcc ata cct gtc tat gct tcc ctc aca cct cag tcc agg ccc 1156

Arg Leu Ala Ile Pro Val Tyr Ala Ser Leu Thr Pro Gln Ser Arg Pro

360

365

370

375

agg ccc ccc aag gac agt cag gcc tcc cct gcc cac tct gcc atg gca 1204

Arg Pro Pro Lys Asp Ser Gln Ala Ser Pro Ala His Ser Ala Met Ala

380

385

390

gaa gag gtg aga atc act gct tcc ccc aag agc acc ggg cct aga ccc 1252

Glu Glu Val Arg Ile Thr Ala Ser Pro Lys Ser Thr Gly Pro Arg Pro

395

400

405

agc ctg cgt cct ctg agg ctg gag gtg aaa cgg gat gtt aac aag cct 1300

Ser Leu Arg Pro Leu Arg Leu Glu Val Lys Arg Asp Val Asn Lys Pro

410

415

420

aca agg caa aag cgg gag gaa gat gag gag gag gag gag gaa gaa gaa 1348

Thr Arg Gln Lys Arg Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu

425

430

435

gaa gag gaa gaa gaa aaa gaa gag gaa gaa gag gag tgg ggc agg aag 1396

Glu Glu Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu Glu Glu Glu Trp Gly Arg Lys

440

445

450

455

aga cca ggt cgt ggc ctg cca tgg acc aaa cta ggg agg aag atg gac 1444
 Arg Pro Gly Arg Gly Leu Pro Trp Thr Lys Leu Gly Arg Lys Met Asp
 460 465 470

agc tcc gtg tgc ccc gtg cgg cgc tcc agg aga ctg aat cca gag ctg 1492
 Ser Ser Val Cys Pro Val Arg Arg Ser Arg Arg Leu Asn Pro Glu Leu
 475 480 485

ggt ccc tgg ctg aca ttc act gat gag ccc tta ggt gct ctg ccc tcg 1540
 Gly Pro Trp Leu Thr Phe Thr Asp Glu Pro Leu Gly Ala Leu Pro Ser
 490 495 500

atg tgc ctg gat aca gag acc cac aac ctg gag gaa gac ctg ggc agc 1588
 Met Cys Leu Asp Thr Glu Thr His Asn Leu Glu Glu Asp Leu Gly Ser
 505 510 515

ctc aca gac agt agt caa ggc cgg cag ctc ccc cag gga tcc cag atc 1636
 Leu Thr Asp Ser Ser Gln Gly Arg Gln Leu Pro Gln Gly Ser Gln Ile
 520 525 530 535

ccc gcc ctg gaa agc ccc tgt gag agt ggg tgc gga gac aca gat gaa 1684
 Pro Ala Leu Glu Ser Pro Cys Glu Ser Gly Cys Gly Asp Thr Asp Glu
 540 545 550

gat cca agc tgc cca cag ccc act tcc aga gac tcc tcc agg tgc ctc 1732
 Asp Pro Ser Cys Pro Gln Pro Thr Ser Arg Asp Ser Ser Arg Cys Leu
 555 560 565

atg ctg gcc ttg tca caa agc gac tct ctt ggc aag aag agc ttt gag 1780

Met Leu Ala Leu Ser Gln Ser Asp Ser Leu Gly Lys Lys Ser Phe Glu
570 575 580

gag tcc ctg acg gtg gag ctt tgc ggc acg gca gga ctc acg cca ccc 1828
Glu Ser Leu Thr Val Glu Leu Cys Gly Thr Ala Gly Leu Thr Pro Pro
585 590 595

acc aca cct cca tac aag cca atg gag gag gac ccc ttc aag cca gac 1876
Thr Thr Pro Pro Tyr Lys Pro Met Glu Glu Asp Pro Phe Lys Pro Asp
600 605 610 615

acc aag ctc agc cca ggc caa gac aca gct ccc agc ctt ccc tcc ccc 1924
Thr Lys Leu Ser Pro Gly Gln Asp Thr Ala Pro Ser Leu Pro Ser Pro
620 625 630

gag gct ctt ccg ctc aca gcc acc cca gga gct tcc cac aag ctg ccc 1972
Glu Ala Leu Pro Leu Thr Ala Thr Pro Gly Ala Ser His Lys Leu Pro
635 640 645

aag agg cac cca gag cga agc gag ctc ctg tcc cat ttg cag cat gcc 2020
Lys Arg His Pro Glu Arg Ser Glu Leu Leu Ser His Leu Gln His Ala
650 655 660

aca acc caa cca gtc tca cag gct ggc cag aag cgc ccc ttc tcc tgc 2068
Thr Thr Gln Pro Val Ser Gln Ala Gly Gln Lys Arg Pro Phe Ser Cys
665 670 675

tcc ttt gga gac cac gac tac tgc cag gtg ctc agg cca gag gct gcc 2116
Ser Phe Gly Asp His Asp Tyr Cys Gln Val Leu Arg Pro Glu Ala Ala

680

685

690

695

ctg cag agg aag gtg ctg cgg tcc tgg gag cca atc ggg gtc cac ctt 2164

Leu Gln Arg Lys Val Leu Arg Ser Trp Glu Pro Ile Gly Val His Leu

700

705

710

gaa gac ttg gcc cag cag ggt gcc cct ctg cca acg gaa aca aag gcc 2212

Glu Asp Leu Ala Gln Gln Gly Ala Pro Leu Pro Thr Glu Thr Lys Ala

715

720

725

cct agg agg gag gca aac cag aac tgt gac cct acc cac aag gac agc 2260

Pro Arg Arg Glu Ala Asn Gln Asn Cys Asp Pro Thr His Lys Asp Ser

730

735

740

atg cag cta aga gac cat gag atc cgt gcc agt ctc aca aag cac ttt 2308

Met Gln Leu Arg Asp His Glu Ile Arg Ala Ser Leu Thr Lys His Phe

745

750

755

ggg ctg ctg gag act gct ctg gaa ggt gaa gac ctg gcg tcc tgt aaa 2356

Gly Leu Leu Glu Thr Ala Leu Glu Gly Glu Asp Leu Ala Ser Cys Lys

760

765

770

775

agc ccg gag tat gac acc gta ttt gag gac agc agc agc agc agt ggc 2404

Ser Pro Glu Tyr Asp Thr Val Phe Glu Asp Ser Ser Ser Ser Ser Gly

780

785

790

gag agt agc ttc ctg ctt gag gag gag gag gaa gag gag gag gga ggg 2452

Glu Ser Ser Phe Leu Leu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly Gly

795

800

805

gaa gag gac gat gaa gga gag gac tca ggg gtc agc cct ccc tgc tct 2500

Glu Glu Asp Asp Glu Gly Glu Asp Ser Gly Val Ser Pro Pro Cys Ser

810

815

820

gat cac tgc ccc tac cag agc cca ccc agt aag gcc agt cgg cag ctc 2548

Asp His Cys Pro Tyr Gln Ser Pro Pro Ser Lys Ala Ser Arg Gln Leu

825

830

835

tgc tcc cga agc cgc tcc agt tcc ggc tcc tcg tcc tgc agc tcc tgg 2596

Cys Ser Arg Ser Arg Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Cys Ser Ser Trp

840

845

850

855

tca cca gcc acc cgg aag aac ttc aga cgt gag agc aga ggg ccc tgt 2644

Ser Pro Ala Thr Arg Lys Asn Phe Arg Arg Glu Ser Arg Gly Pro Cys

860

865

870

tca gat gga acc cca agc gtc cgg cat gcc agg aag cgg cgg gaa aag 2692

Ser Asp Gly Thr Pro Ser Val Arg His Ala Arg Lys Arg Arg Glu Lys

875

880

885

gcc atc ggt gaa ggc cgt gtg gta tac att cga aat ctc tcc agt gac 2740

Ala Ile Gly Glu Gly Arg Val Val Tyr Ile Arg Asn Leu Ser Ser Asp

890

895

900

atg agc tct cgg gaa cta aag aag cgc ttt gag gtg ttc ggt gag att 2788

Met Ser Ser Arg Glu Leu Lys Lys Arg Phe Glu Val Phe Gly Glu Ile

905

910

915

gta gag tgc cag gtg ctg acg aga agt aaa aga ggc cag aag cac ggt 2836
Val Glu Cys Gln Val Leu Thr Arg Ser Lys Arg Gly Gln Lys His Gly
920 925 930 935

ttt atc acc ttc cgg tgt tca gag cac gct gcc ctg tcc gtg agg aac 2884
Phe Ile Thr Phe Arg Cys Ser Glu His Ala Ala Leu Ser Val Arg Asn
940 945 950

ggc gcc acc ctg aga aag cgc aat gag ccc tcc ttc cac ctg agc tat 2932
Gly Ala Thr Leu Arg Lys Arg Asn Glu Pro Ser Phe His Leu Ser Tyr
955 960 965

gga ggg ctc cgg cac ttc cgt tgg ccc aga tac act gac tat gat ccc 2980
Gly Gly Leu Arg His Phe Arg Trp Pro Arg Tyr Thr Asp Tyr Asp Pro
970 975 980

aca tct gag gag tcc ctt ccc tca tct ggg aaa agc aag tac gaa gcc 3028
Thr Ser Glu Glu Ser Leu Pro Ser Ser Gly Lys Ser Lys Tyr Glu Ala
985 990 995

atg gat ttt gac agc tta ctg aaa gag gcc cag cag agc ctg cat tga 3076
Met Asp Phe Asp Ser Leu Leu Lys Glu Ala Gln Gln Ser Leu His
1000 1005 1010 1015

tatcagcctt aaccttcgag gaatacctca atacctcaga caaggccctt ccaatatgtt 3136

tacgttttca aagaaaagag tatatgagaa ggagagcgag cgagcgagcg agcgagcgag 3196

tgagcgtgag agatcacaca ggagagagaa agacttgaat ctgctgtcgt ttcctttaaa 3256

aaaaaaaaa aaaaaactcg acggccaagt cggcctcct ttagtgaggg ttaatttggtg 3316

atcccgggtg gcatccctgt gaccctcc 3345

<210> 2

<211> 1014

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Ala Gly Asn Asp Cys Gly Ala Leu Leu Asp Glu Glu Leu Ser Ser

1 5 10 15

Phe Phe Leu Asn Tyr Leu Ser Asp Thr Gln Gly Gly Asp Ser Gly Glu

20 25 30

Glu Gln Leu Cys Ala Asp Leu Pro Glu Leu Asp Leu Ser Gln Leu Asp

35 40 45

Ala Ser Asp Phe Asp Ser Ala Thr Cys Phe Gly Glu Leu Gln Trp Cys

50 55 60

Pro Glu Thr Ser Glu Thr Glu Pro Ser Gln Tyr Ser Pro Asp Asp Ser

65 70 75 80

Glu Leu Phe Gln Ile Asp Ser Glu Asn Glu Ala Leu Leu Ala Ala Leu

85 90 95

Thr Lys Thr Leu Asp Asp Ile Pro Glu Asp Asp Val Gly Leu Ala Ala

100 105 110

Phe Pro Glu Leu Asp Glu Gly Asp Thr Pro Ser Cys Thr Pro Ala Ser
115 120 125
Pro Ala Pro Leu Ser Ala Pro Pro Ser Pro Thr Leu Glu Arg Leu Leu
130 135 140
Ser Pro Ala Ser Asp Val Asp Glu Leu Ser Leu Leu Gln Lys Leu Leu
145 150 155 160
Leu Ala Thr Ser Ser Pro Thr Ala Ser Ser Asp Ala Leu Lys Asp Gly
165 170 175
Ala Thr Trp Ser Gln Thr Ser Leu Ser Ser Arg Ser Gln Arg Pro Cys
180 185 190
Val Lys Val Asp Gly Thr Gln Asp Lys Lys Thr Pro Thr Leu Arg Ala
195 200 205
Gln Ser Arg Pro Cys Thr Glu Leu His Lys His Leu Thr Ser Val Leu
210 215 220
Pro Cys Pro Arg Val Lys Ala Cys Ser Pro Thr Pro His Pro Ser Pro
225 230 235 240
Arg Leu Leu Ser Lys Glu Glu Glu Glu Glu Val Gly Glu Asp Cys Pro
245 250 255
Ser Pro Trp Leu Thr Pro Ala Ser Pro Gln Asp Ser Leu Ala Gln Asp
260 265 270
Thr Ala Ser Pro Asp Ser Ala Gln Pro Pro Glu Glu Asp Val Arg Ala
275 280 285
Met Val Gln Leu Ile Arg Tyr Met His Thr Tyr Cys Leu Pro Gln Arg
290 295 300
Lys Leu Pro Gln Arg Ala Pro Glu Pro Ile Pro Gln Ala Cys Ser Ser
305 310 315 320
Leu Ser Arg Gln Val Gln Pro Arg Ser Arg His Pro Pro Lys Ala Phe
325 330 335
Trp Thr Glu Phe Ser Ile Leu Arg Glu Leu Leu Ala Gln Asp Ile Leu

340 345 350
Cys Asp Val Ser Lys Pro Tyr Arg Leu Ala Ile Pro Val Tyr Ala Ser
355 360 365
Leu Thr Pro Gln Ser Arg Pro Arg Pro Pro Lys Asp Ser Gln Ala Ser
370 375 380
Pro Ala His Ser Ala Met Ala Glu Glu Val Arg Ile Thr Ala Ser Pro
385 390 395 400
Lys Ser Thr Gly Pro Arg Pro Ser Leu Arg Pro Leu Arg Leu Glu Val
405 410 415
Lys Arg Asp Val Asn Lys Pro Thr Arg Gln Lys Arg Glu Glu Asp Glu
420 425 430
Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Lys Glu Glu Glu
435 440 445
Glu Glu Glu Trp Gly Arg Lys Arg Pro Gly Arg Gly Leu Pro Trp Thr
450 455 460
Lys Leu Gly Arg Lys Met Asp Ser Ser Val Cys Pro Val Arg Arg Ser
465 470 475 480
Arg Arg Leu Asn Pro Glu Leu Gly Pro Trp Leu Thr Phe Thr Asp Glu
485 490 495
Pro Leu Gly Ala Leu Pro Ser Met Cys Leu Asp Thr Glu Thr His Asn
500 505 510
Leu Glu Glu Asp Leu Gly Ser Leu Thr Asp Ser Ser Gln Gly Arg Gln
515 520 525
Leu Pro Gln Gly Ser Gln Ile Pro Ala Leu Glu Ser Pro Cys Glu Ser
530 535 540
Gly Cys Gly Asp Thr Asp Glu Asp Pro Ser Cys Pro Gln Pro Thr Ser
545 550 555 560
Arg Asp Ser Ser Arg Cys Leu Met Leu Ala Leu Ser Gln Ser Asp Ser
565 570 575

Leu Gly Lys Lys Ser Phe Glu Glu Ser Leu Thr Val Glu Leu Cys Gly
580 585 590

Thr Ala Gly Leu Thr Pro Pro Thr Thr Pro Pro Tyr Lys Pro Met Glu
595 600 605

Glu Asp Pro Phe Lys Pro Asp Thr Lys Leu Ser Pro Gly Gln Asp Thr
610 615 620

Ala Pro Ser Leu Pro Ser Pro Glu Ala Leu Pro Leu Thr Ala Thr Pro
625 630 635 640

Gly Ala Ser His Lys Leu Pro Lys Arg His Pro Glu Arg Ser Glu Leu
645 650 655

Leu Ser His Leu Gln His Ala Thr Thr Gln Pro Val Ser Gln Ala Gly
660 665 670

Gln Lys Arg Pro Phe Ser Cys Ser Phe Gly Asp His Asp Tyr Cys Gln
675 680 685

Val Leu Arg Pro Glu Ala Ala Leu Gln Arg Lys Val Leu Arg Ser Trp
690 695 700

Glu Pro Ile Gly Val His Leu Glu Asp Leu Ala Gln Gln Gly Ala Pro
705 710 715 720

Leu Pro Thr Glu Thr Lys Ala Pro Arg Arg Glu Ala Asn Gln Asn Cys
725 730 735

Asp Pro Thr His Lys Asp Ser Met Gln Leu Arg Asp His Glu Ile Arg
740 745 750

Ala Ser Leu Thr Lys His Phe Gly Leu Leu Glu Thr Ala Leu Glu Gly
755 760 765

Glu Asp Leu Ala Ser Cys Lys Ser Pro Glu Tyr Asp Thr Val Phe Glu
770 775 780

Asp Ser Ser Ser Ser Ser Gly Glu Ser Ser Phe Leu Leu Glu Glu Glu
785 790 795 800

Glu Glu Glu Glu Glu Gly Gly Glu Glu Asp Asp Glu Gly Glu Asp Ser

805	810	815
Gly Val Ser Pro Pro Cys Ser Asp His Cys Pro Tyr Gln Ser Pro Pro		
820	825	830
Ser Lys Ala Ser Arg Gln Leu Cys Ser Arg Ser Arg Ser Ser Ser Gly		
835	840	845
Ser Ser Ser Cys Ser Ser Trp Ser Pro Ala Thr Arg Lys Asn Phe Arg		
850	855	860
Arg Glu Ser Arg Gly Pro Cys Ser Asp Gly Thr Pro Ser Val Arg His		
865	870	875
Ala Arg Lys Arg Arg Glu Lys Ala Ile Gly Glu Gly Arg Val Val Tyr		
885	890	895
Ile Arg Asn Leu Ser Ser Asp Met Ser Ser Arg Glu Leu Lys Lys Arg		
900	905	910
Phe Glu Val Phe Gly Glu Ile Val Glu Cys Gln Val Leu Thr Arg Ser		
915	920	925
Lys Arg Gly Gln Lys His Gly Phe Ile Thr Phe Arg Cys Ser Glu His		
930	935	940
Ala Ala Leu Ser Val Arg Asn Gly Ala Thr Leu Arg Lys Arg Asn Glu		
945	950	955
Pro Ser Phe His Leu Ser Tyr Gly Gly Leu Arg His Phe Arg Trp Pro		
965	970	975
Arg Tyr Thr Asp Tyr Asp Pro Thr Ser Glu Glu Ser Leu Pro Ser Ser		
980	985	990
Gly Lys Ser Lys Tyr Glu Ala Met Asp Phe Asp Ser Leu Leu Lys Glu		
995	1000	1005
Ala Gln Gln Ser Leu His		
1010		

【図面の簡単な説明】

【図1】

ERRL1およびPGC-1の間の一次アミノ酸配列の比較である。星印は同一のアミノ酸を示す。数字は、最初のメチオニンを1としたアミノ酸の位置を示す。LXXLLモチーフは太字で表す。下線はグルタミン酸 (E) 繰り返しおよびセリン-アルギニン (SR) に富む領域である。推定RNA結合モチーフは箱で囲まれている。暫定的ドメインの境界は垂直線で示される。ERRL1のスプライシング変異は、39のアミノ酸 (156番目のロイシンから194番目のリジン) が欠けていた。

【図2】

ERRL1 mRNAの発現プロファイル。Aは、様々な成熟マウス組織由来の20 μ gの全RNAをERRL1、PGC-1、PRC、ERR1、ERR3 cDNAをプローブとして使用して分析した結果である。28S RNAのエチジウムブロマイド染色も示す。Bは、3T3-L1細胞をデキサメタゾン、1-メチル-3-イソブチルキサンチンおよびインシュリン (0日目に添加) による処理によって脂肪細胞に分化誘導し、RNAを単離し、ノーザンブロット分析した結果である。プロットは続いて、それぞれのプローブとハイブリダイズした。Cは、3T3-L1および10T1/2細胞中のERRL1、ERR1およびMCAD mRNAの発現 (－: 前脂肪細胞、＋: 成熟脂肪細胞) を観察した結果である。

【図3】

PGG-1およびERRL1の種々の核内受容体の「タンパク質リガンド」としてのプロファイル。様々な核内受容体に対するPGG-1 (A) およびERRL1 (B) の転写活性化能をトランスフェクションアッセイで調べた。実験を三重に行い、得られた平均値を誘導倍率として示し、ここでは、PGG-1およびERRL1の非存在下での各々のGAL4融合核内受容体のLuc活性が基準値とされている。エラー・バーは標準偏差。Cは、ERREを介する完全長ERRが媒介する転写に対するERRL1の投与量に依存した活性。様々な量のpCMX-ERRL1 (0から200 ng) は、CV-1細胞における250 ngのTK-LucまたはERRE-Lucの存在下、30 ngのpCMX-ERR1またはpCMX-ERR3と共にトランスフェクトされた。実験を三重に行いその平均値が誘導倍率として示される。ここでは、ERRL1の非存在下でTK-LucのLuc活性が基準値となる。エラー・バーは標準偏差。Dは、³⁵S標識ERRL1は、in vitroでGST-ERR1およびGST-ERR3と強力な相互関

係を示すことを確認した結果である。オートラジオグラフは、プルダウンされたタンパク質 (GST-ERR1およびGST-ERR3)、およびGSTプルダウン分析に対して使用された³⁵S標識ERRL1の全量の10% (Input) を示す。この分析に使用されたGST融合タンパク質を含むSDS-PAGEゲルのCBB染色も示されている。Eは、10T1/2細胞におけるERR1またはERR3と組み合わされたERRL1またはPGC-1の外来性発現によるMCAD mRNAの発現増加を示した結果である。細胞が集密後一日して、全RNAを単離し、MCADおよびERRL1 cDNAをプローブとして使用してノーザン・プロット (レーンあたり20 μ g) によって分析した。MCAD mRNAの相対的デンシメトリー値も各レーンの下に記載した。

【図4】

ERRL1マウスの作成。Aは、ERRL1トランスジーンおよびサザン
0. プロット (プローブ1) およびノーザンプロット (プローブ1およびプローブ2) に使用されたプローブの位置の概略図を示す。Bは、二つのトランススジェニック系 (A1およびA2) において、各々トランスジーンのコピーが10および12のコピーが含まれていることを示す結果である。Cは、ERRL1マウス (A1系) および同腹子のコントロールマウス由来の各組織におけるERRL1 mRNA発現のノーザンプロット分析の結果である。各レーンは、20 μ gの全RNAを含んでいる。Dは、ERRL1マウスおよび野生型コントロールマウスの骨格筋におけるERRL1、MCAD、ACC2およびUCP-3の発現を測定した結果である。各グループの3匹のマウスを調べた。ノーザンシグナルの定量値 (コントロールは100%) を右に示す。データは、平均 \pm s.e.m (*は $p<0.05$) 。

【図5】

ERRL1マウスの表現型。Aは、食物摂取を毎週測定し、表示された期間におけるマウスあたりの累積食物摂取を示す。データは平均 \pm s.e.m (動物グループあたり $n=6$ 、エラー・バーは記号より小さい、*は $P<0.05$ 、**は $P<0.01$) を示す。Bは、ERRL1マウス (黒丸) と野生型コントロール (白丸) の体重変化を示す結果である。値は、体重の平均 \pm s.e.m (動物グループあたり $n=6$ 、*は $P<0.05$ 、**は $P<0.01$) を示す。幾つかのデータポイントにおいて、エラーバーは記号よりも小さい。Cは、ERRL1マウスにおける腹部脂肪の減少を示す結果である。Dは、野

生型コントロールマウスとERRL1マウスの精巣上体のWAT重量の比較である。カラムは、WAT重量 \pm s.e.m. (動物グループあたり $n=6$ 、*は $P<0.05$)を示す。Eは、ERRL1マウスと同腹の野生型コントロールマウスの白色脂肪組織の形態の比較である。目盛りは $50\mu\text{m}$ を示す。Fは、脂肪細胞の平均直径。細胞の直径はEに示された切片から測定された ($n=20$ 、**は $P<0.01$)。GおよびHは、12週齢のコントロールマウスとERRL1マウスにおける、休息時 (G) および全体 (H) のエネルギー消費を示した結果である。カラムはエネルギー消費の平均値 \pm s.e.m (動物グループにつき $n=6$ 、*は $P<0.05$ 、**は $P<0.01$)を示す。

【図 6】

Aは、KKAy(+)ERRL1(-) (白四角、 $n=8$)、KKAy(-)ERRL1(-) (白丸、 $n=5$)、KKAy(+)ERRL1(+) (黒四角、 $n=5$)、KKAy(-)ERRL1(+) (黒丸、 $n=5$) オスマウスの体重変化を測定した結果である。各グループの体重曲線を繰り返し測定分析 (スーパーANOVA) によって比較した。*は $P<0.05$ 、**は $P<0.01$ 。Bは、12週齢のオスマウスKKAy(+)ERRL1(-) (左)、KKAy(+)ERRL1(+) (中央)、KKAy(-)ERRL1(-) (右) マウスの典型的な写真である。

【図 7】

運動反応およびERRL1マウスにおけるERRL1、MCAD、CS、LDH遺伝子発現の増加。Aは、マウスを静止 (コントロール) またはトレッドミルで2時間運動させた後、骨格筋のmRNAを単離し、各時間点においてノーザンプロット分析した結果である。Bは、ERRL1マウスおよび野生型コントロールマウスにおける骨格筋中のERRL1、MCAD、CSおよびLDH発現量の測定結果である。各グループにつき3匹のオスマウスをノーザンプロット分析で調べた。ノーザン分析 (コントロールを100%として) の定量を右に示す。MCAD発現については図 4 b を参照のこと。データは平均 \pm s.e.m. (*は $P<0.05$ 、**は $P<0.01$)。

【書類名】 図面

【図 1】

ERRL1	MAGNDCGALLDEELSSFFLNYSLTQGGDSGEEQ-LCADLPELDLSOLDASDFDSATCLG	59
PGC-1	MAWDMCSQDSVWSDIECAALVGKDQFLCPDLPELDLSELVDVNDLDTDSFLG	51

ERRL1	ELQWCPETSETEPSQYSPDDSELFQ-IDSENRA-LLAALTKTLDIPEDDVGLAAPPELD	117
PGC-1	GLKWCSDQSEIISNOYNNEPANIFEKIDEENBAMLLAVLTETLDSLPVDEDGLPSFDALT	111

ERRL1	EGDTPSCTPASAPLSAPPSPTLERLLSPASOVDELSSLOKLLLATSSPTASSDALKDGA	177
PGC-1	DGAVTTDNBASPSM---PDGT-----PPQAEKEPSLLKLLAPANTQLSYNECSGLS	163

ERRL1	TWSQTSLS---RSQRPCVKVDGTQDKKTPTL---RAQSRPCTELKHLTSVLP CPRVK	230
PGC-1	TQNHAAHNTHRITNPAIVKTENSWSNKAKSICQOQKPQRRPCSELLKYLTNDPPHTK	223

ERRL1	ACSPTPHSPRLLSKEE-----EEVGEDCPSPW---LTPASPODSLQDTASPDQAQPH	282
PGC-1	PTENRNSSRDKCASKKSHTOPOSQAQKPTLSLPLTPESPNDP---KGSFFEN---	276

ERRL1	EEDVRAMVQLIRYMETYCLPQKRLPQRAPEPIQACSSLSROVQPRSRHPPKAFWTEFSI	341
PGC-1	-----	
ERRL1	LRELLAQDILCDVSKPYRLAIPVYASLTPOSRPRPFKDSQASPAHSAMAREVRITASPKS	401
PGC-1	-----	
ERRL1	TGPRPSLRPLRLLEVKRDVNKPTRQKREDEEEEEEEEEEEEEEEEEEWGRKRPGRGLP	461
PGC-1	-----	
ERRL1	WTKLGRKMDSSVCPVRRSRLNPELGPWLTFTEDEPLGALPSMCLDTETHNLEEDLGSLTD	521
PGC-1	-----	
ERRL1	SSQGRQLPOGSQIPALESPCESGCGDTDEDPCPOPTSRDSSRCIMLALSQSDSLGAKSF	581
PGC-1	-----KTI	279

ERRL1	EESLTVELCGTAGLTPPTTPFYKPMREDPFKPDTKLSPGQDTAPSLPSPEAL--PLTATP	639
PGC-1	ERTLSVELSGTAGLTPPTTPPHKANQDNPFKASPKLKPSCKTVVPPTKRARIYSECSGTQ	339

ERRL1	GASHKLPKRHPERSEILSHLOHAT--TOFVSOAGQKRPFCSCFGDHDYQVLRPEAALOR	697
PGC-1	G-SHST-KKGPEQSEIYAOLSKSGLSRGHEBRKTRPSLRFLFGDHDYQSLNSKTDLI	397

ERRL1	KV---LRSWEPIGVHLEDLAQQGAPLPTETKAP---RR---EANQNCDPHKDSMQLRDHE	749
PGC-1	NISOELQDSRQLDFKASCDWQHICSSSTDGQCYLRETLEASKQVSPCSTRK-QLQDQE	456

ERRL1	IRASLTKHFGLLTALGEDLASCKSPYDVTVFEDSSSS-----SGES-SFLLLEEEE	802
PGC-1	IRAEINXHFHGPCQAVF-DDKSDKTSZLRDGDFSNEQFSKLPVFINSGLAMDGFLDDESD	515

ERRL1	EEEGEEDDEGEDS---GVSPPCSD-HCFYQ---SPP---SKASROLCSRSRSSSGSS	851
PGC-1	ESDKLSYPWDGTOPYSLFDVSPSCSSFNSPCRDVSPPKSLFSQRPORMBSRSRSESRHR	575

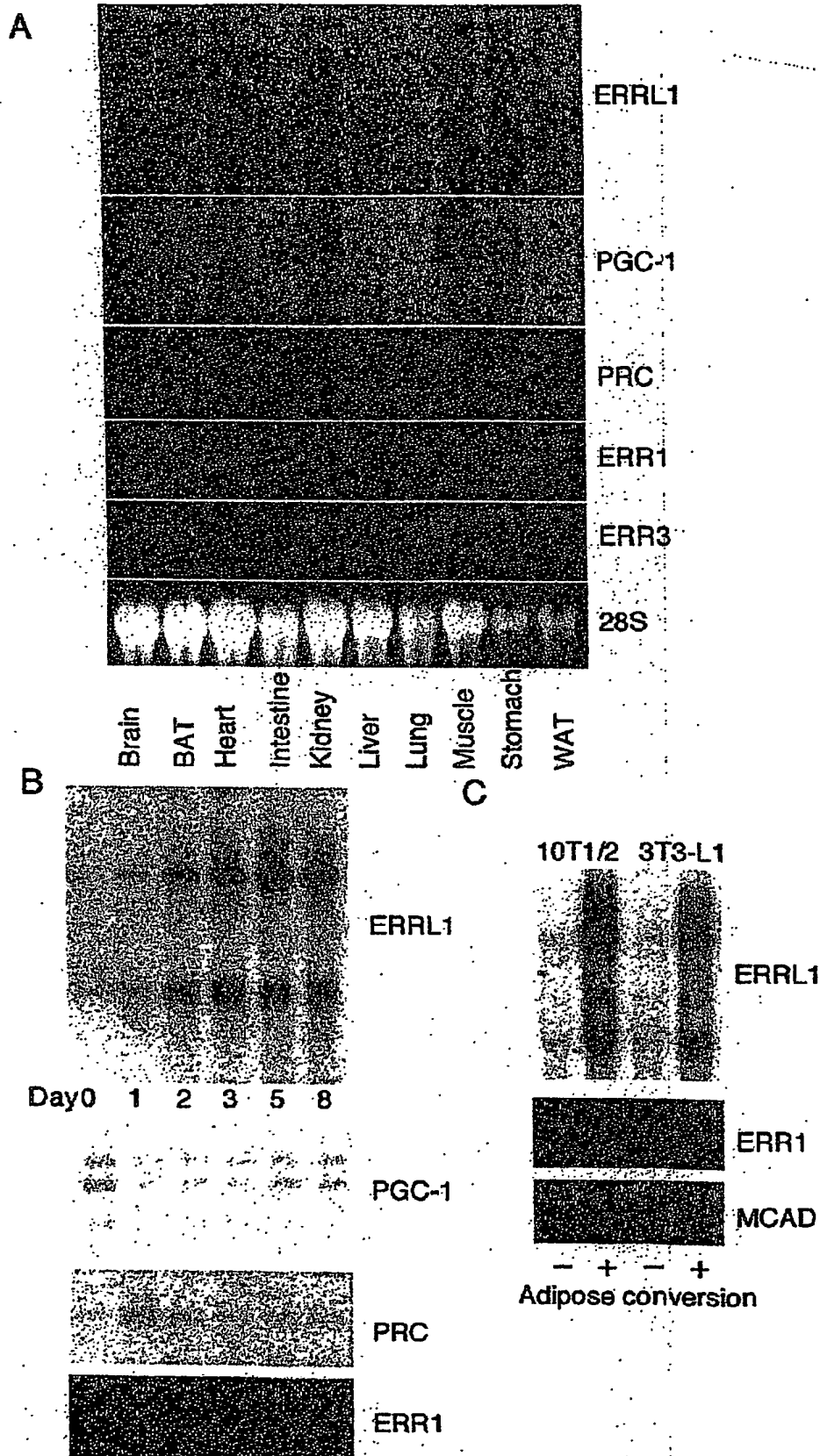
ERRL1	SCS-----SWSPATKRN-----FRRESRGPCS-----DG	875
PGC-1	SCSRSPYSRGRSRSPGSRSSSRSCYYYESSHYRHRTHNSPLYVRSRSPYSRRPRYDS	635

ERRL1	TPSVRHAR-----KRE-----KAIGEGVYVYIRNLSSDMSSRELKRR	913
PGC-1	YEAYEHERLKRDEYRKEHEKRESERAKORERQKAIERRVYVVGKIRPDTRTELRR	695

ERRL1	FEVFGIEVECVLTKSRGQKHGFTFR--CSEHAALSVRNGATLKRNEPSFHLSYGGL	971
PGC-1	FEVFGIEVECTVNRDD-GDSYGFITYRYTCDAFAL--ENGYTLRSNETDFELYFCGR	752

ERRL1	RHFRWPRYTDYDPTSEESLPSSGSKSYEAMDFDSLLEKAQQLH	1014
PGC-1	KQFFKSNYADLDTNSDDFDPASTKSKYDSLDFDSLLEKAQSLRR	796

【図 2】



BEST AVAILABLE COPY

A

PGC-1

GAL4
4 x UAS
Luc

AR ER α GR FXR RXR α RXR β RXR γ PPARG PPAR γ ERR1 ERR2 ERR3 HNF4 α NUR1 NOR ROR α SF1 COUP II TR2-11 RevErbA

Luc (fold induction)

B

ERRL1

GAL4
4 x UAS
Luc

AR ER α GR FXR RXR α RXR β RXR γ PPARG PPAR γ ERR1 ERR2 ERR3 HNF4 α NUR1 NOR ROR α SF1 COUP II TR2-11 RevErbA

Luc (fold induction)

C

ERRE

GAL4
4 x UAS
Luc

ERRL1 (0-200ng)

ERRL1	tk-Luc	ERRE-Luc	ERR1	ERR3
-	+	-	+	-
+	-	+	-	-
+	+	+	+	-
+	-	-	-	+

Luc (fold induction)

D

Input (10%) GST alone GST-ERR1 GST-ERR3

35S-ERRL1

CBB staining

E

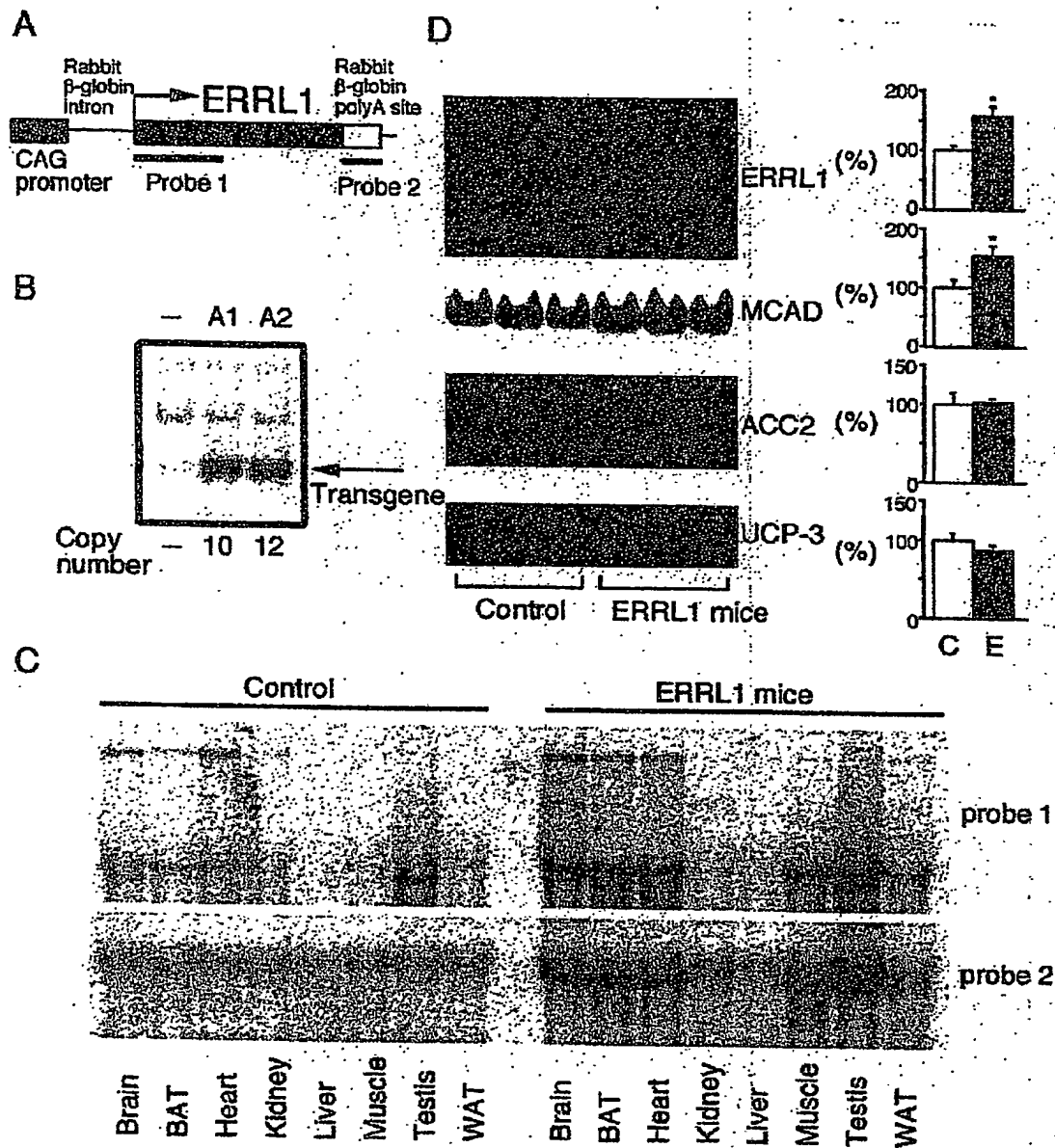
Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MCAD	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Counts	100	97	96	154	191	226	188	209	139

ERRL1

GFP ERRL1 PGC-1 GFP ERRL1 PGC-1 GFP ERRL1 PGC-1

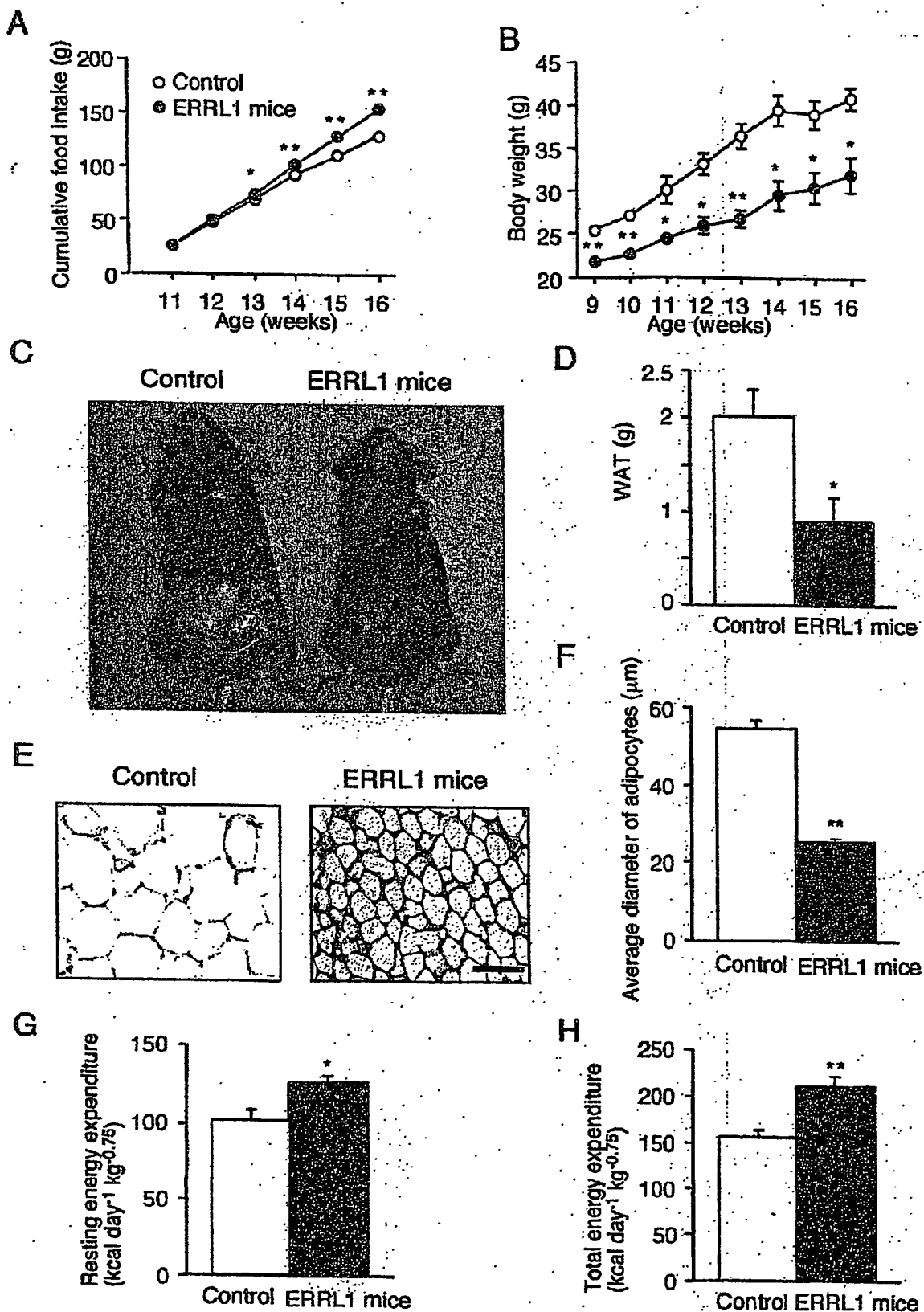
GFP ERR1 ERR3

【図 4】



BEST AVAILABLE COPY

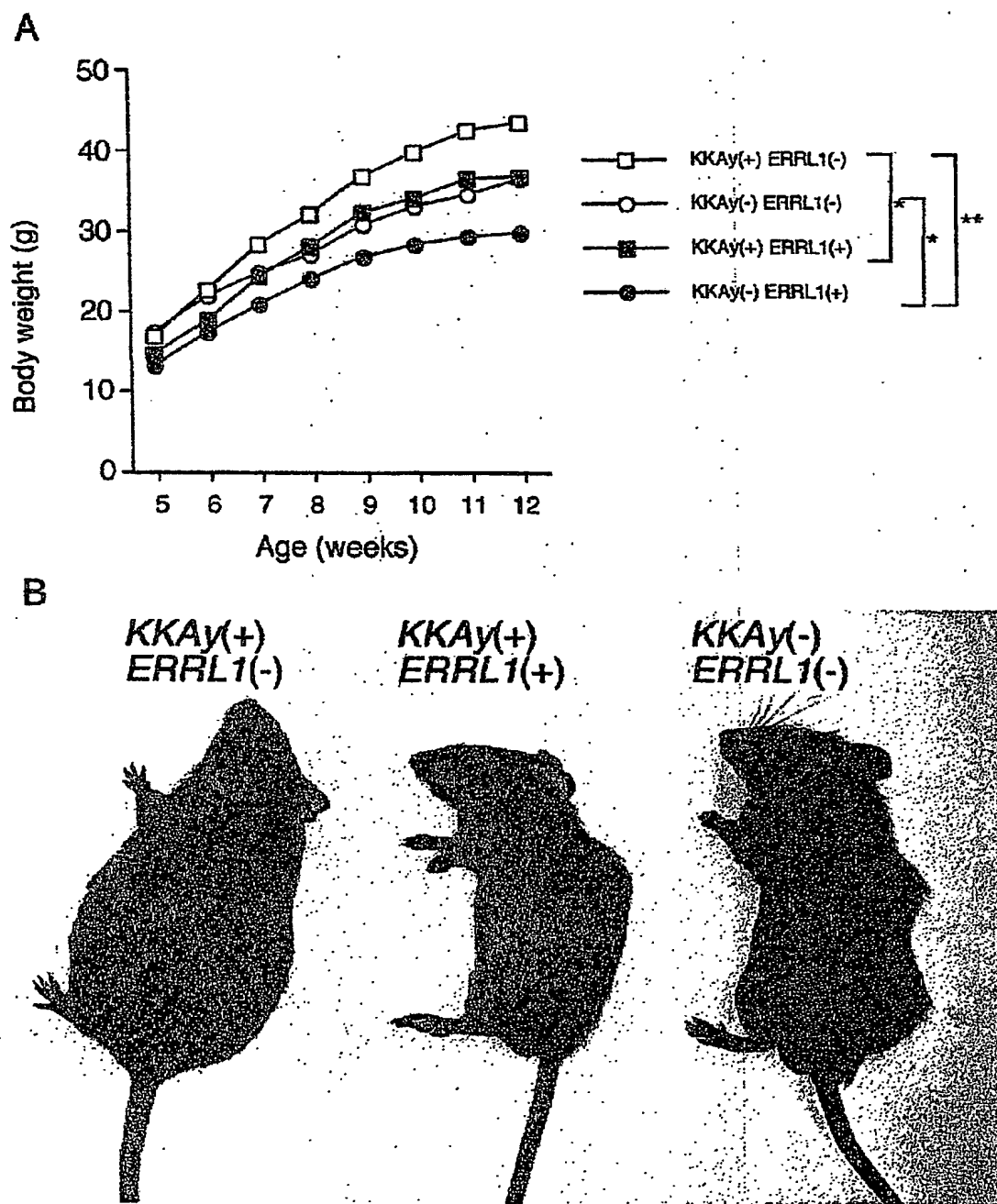
【図5】



BEST AVAILABLE COPY

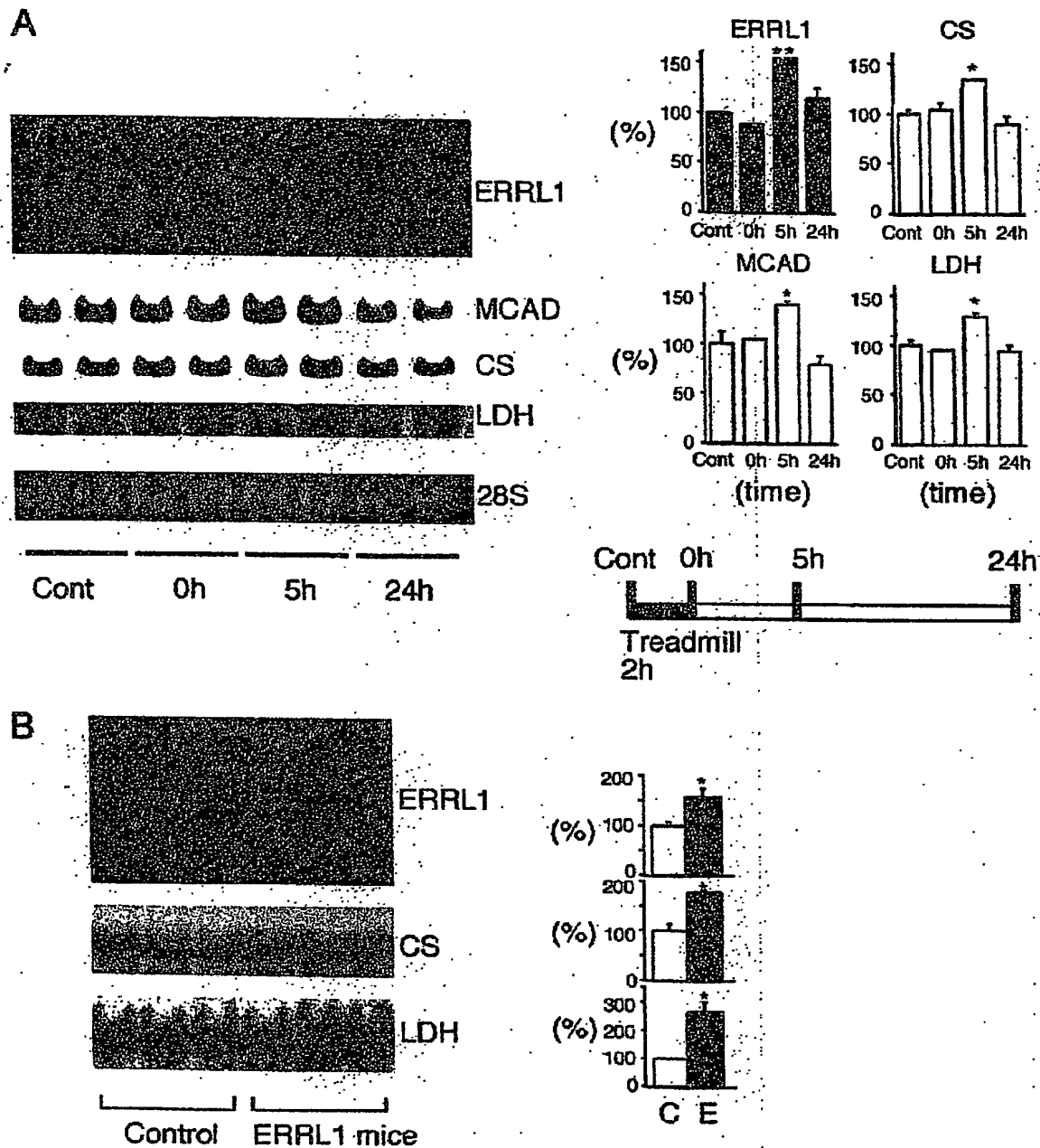
出証特2003-3074516

【図 6】



BEST AVAILABLE COPY

【図 7】



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 核内の孤児受容体ERRに対する新しいタンパク質性リガンド分子ERRL1と、このリガンド分子ERRL1等を指標として肥満や糖尿病の治療薬成分をスクリーニングする方法を提供する。

【解決手段】 配列番号2のアミノ酸配列を有し、核内受容体ERRのリガンド分子として機能するマウス由来のタンパク質ERRL1と、このERRL1タンパク質をコードするマウス遺伝子、並びに細胞または動物個体における前記ERRL1タンパク質等の発現変化を指標として肥満および／または糖尿病の治療薬成分をスクリーニングする方法。

【選択図】 なし

特願 2002-231999

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団

特願 2002-231999

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[390000745]

1. 変更年月日

1990年 9月21日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府吹田市古江台6丁目2番4号

氏 名

財団法人大阪バイオサイエンス研究所